

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional

22 JUL 2004

(43) Fecha de publicación internacional
31 de Julio de 2003 (31.07.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 03/062424 A1(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C12N 15/11,
15/86, A61K 39/125, 39/42

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES03/00038

(22) Fecha de presentación internacional:
24 de Enero de 2003 (24.01.2003)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200200158 24 de Enero de 2002 (24.01.2002) ES(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006
MADRID (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): EN-
JUANES SÁNCHEZ, Luis [ES/ES]; CENTRO NA-
CIONAL DE BIOTECNOLOGÍA, CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, CSIC. Campus
de Cantoblanco, E-28049 MADRID (ES). ESCORS MU-
RUGARREN, David [ES/ES]; CENTRO NACIONAL
DE BIOTECNOLOGÍA, CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, CSIC. Campus
de Cantoblanco, E-28049 MADRID (ES). ORTEGO
ALONSO, Javier [ES/ES]; CENTRO NACIONAL DE
BIOTECNOLOGÍA, CONSEJO SUPERIOR DE IN-
VESTIGACIONES CIENTÍFICAS, CSIC. Campus de
Cantoblanco, E-28049 MADRID (ES).(74) Mandatario: REPRESA SÁNCHEZ, Domingo; OFIC-
INA DE TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA, CON-
SEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFI-
CAS, C/ Serrano, 113, E-28006 MADRID (ES).(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI,
SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: NUCLEIC ACID SEQUENCE COMPRISING THE RNA PACKAGING SIGNAL OF A GROUP 1 CORONAVIRUS
AND THE APPLICATIONS THEREOF(54) Título: SECUENCIA DE ACIDO NUCLEICO QUE COMPRENDE LA SEÑAL DE ENCAPSIDACIÓN DEL RNA DE UN
CORONAVIRUS DEL GRUPO 1 Y SUS APLICACIONES(57) Abstract: The invention relates to a nucleic acid sequence comprising the RNA packaging signal of a group 1 coronavirus,
such as transmissible gastroenteritis virus of swine (TGEV), which is located between nucleotides 100 and 649 of the genome of said
coronavirus. The inventive sequence can be employed to produce viral vectors for use in basic and applied research, for example, in
developing systems of expressing products of interest, vaccine vectors and gene therapy.(57) Resumen: La secuencia de ácido nucleico comprende la señal de encapsidación del RNA de un coronavirus del grupo 1, tal
como el virus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV), situada entre los nucleótidos 100 y 649 del genoma de dicho coro-
navirus. Dicha secuencia puede utilizarse para construir vectores virales útiles en investigación básica y aplicada, por ejemplo, en el
desarrollo de sistemas de expresión de productos de interés, vectores vacunales y terapia génica.

WO 03/062424 A1

SECUENCIA DE ACIDO NUCLEICO QUE COMPRENDE LA SEÑAL DE ENCAPSIDACIÓN DEL RNA DE UN CORONAVIRUS DEL GRUPO 1 Y SUS APLICACIONES

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se relaciona con una secuencia de ácido nucleico que comprende la señal de encapsidación (SE) del RNA de un coronavirus del grupo 1 y su empleo en la construcción de vectores útiles en virología y sanidad.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los virus con genoma RNA (virus RNA) son fuentes potenciales de vectores virales útiles para fines vacunales o de terapia génica. Este tipo de aplicaciones requiere que los vectores virales sean bioseguros. Aunque los vectores virales derivados de virus RNA son bastante seguros, no puede descartarse la posibilidad de que recuperen su virulencia por recombinación con virus circulantes, lo que limita considerablemente sus posibilidades de uso tanto en investigación básica como en investigación aplicada. Por este motivo, existe la necesidad de desarrollar vectores virales derivados de virus RNA con elevada bioseguridad.

Entre los vectores virales derivados de virus RNA potencialmente útiles en sanidad humana o animal se encuentran los vectores virales derivados de coronavirus (solicitud de patente española P9902673). Los coronavirus son virus ssRNA(+) que presentan el genoma más grande conocido para un virus RNA, con una longitud comprendida entre 27,6 y 31 kilobases (kb). El genoma de los coronavirus comprende una secuencia de nucleótidos implicada en la encapsidación del genoma en los viriones, en adelante secuencia o señal de encapsidación (SE). La ausencia o alteración de dicha SE provoca una encapsidación reducida o nula del genoma en los viriones lo que puede resultar interesante para determinadas aplicaciones.

Aunque se ha caracterizado una SE de 61 nt en el genoma del coronavirus MHV (virus de la hepatitis murina) localizada en la ORF 1b, 1,4 kilobases (kb) a partir del extremo 3' del gen 1 y una señal homóloga en el genoma del coronavirus bovino (BCoV) (Cologna y Hogue, 2000; Fosmire y cols., 1992; Woo y cols., 1997), existe la necesidad de localizar y caracterizar dichas SE en otros coronavirus potencialmente útiles en diversas aplicaciones, tanto de investigación básica como biomédica, por ejemplo, del coronavirus TGEV (virus de la

gastroenteritis porcina transmisible). La localización y caracterización de dicha SE en otros coronavirus permitiría construir nuevos vectores virales derivados de dichos coronavirus, con un nivel de bioseguridad más elevado y ampliar de este modo el arsenal de herramientas disponibles para investigación básica y aplicada.

5

COMPENDIO DE LA INVENCION

Ahora se ha localizado la región del genoma del virus TGEV que comprende la SE de dicho virus lo que ha permitido el desarrollo de nuevos vectores caracterizados por su elevado grado de bioseguridad. El nuevo vector proporcionado por esta invención puede ser utilizado en
10 investigación básica o aplicada, por ejemplo, para obtener productos de interés (proteínas, enzimas, anticuerpos, etc.), como vector vacunal o en terapia génica tanto en humanos como en animales. Este nuevo vector presenta, además de la capacidad de infectar las mucosas entéricas y respiratorias, es decir, los sitios más adecuados para la inducción de inmunidad secretoria y de que su tropismo puede ser controlado mediante la modificación del gen S (spike), la ventaja de
15 que puede construirse con un elevado grado de bioseguridad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 ilustra la selección de las regiones que potencialmente contienen la señal de encapsidación de TGEV. La barra de la parte superior de la figura representa el minigenoma
20 M33. Sobre la barra del minigenoma se indican las dos regiones del extremo 5' del minigenoma M33 delimitadas por flechas de doble cabeza (regiones A y B). Debajo de las zonas A y B se muestran esquemáticamente las subregiones investigadas. Los números sobre la barra y debajo de ella indican las posiciones del genoma del virus TGEV.

La Figura 2 es un esquema ilustrativo del clonaje de las regiones potencialmente
25 implicadas en la encapsidación en el minigenoma M39-GUS. Este esquema representa al minigenoma M39-GUS con los insertos correspondientes a las regiones definidas en la Figura 1 (Ai o B) clonadas bajo el control de la TRS del minigenoma. Se muestran las secuencias de la TRS, la secuencia conservada 5'-CUAAAC-3', el inserto (Ai o B) y el gen *gus* en azul. Se indica la posición de las secuencias de restricción *Sa*II que flanquean a los insertos clonados en
30 el minigenoma. Los números indican las posiciones en el genoma del virus TGEV.

La Figura 3 muestra la estructura del RNA DI-C y de los minigenomas M39 y M33, mutantes de delección de la DI-C. El RNA DI-C está formado por cuatro regiones discontinuas

del genoma del virus TGEV (I, n, m y IV). Estas regiones comprenden 2,1 kb del extremo 5' del genoma, la ORF 1b casi completa incluyendo la zona de solapamiento entre las ORFs 1a y 1b, el extremo 5' del gen S, la ORF 7 incompleta y la UTR del extremo 3'. A partir del genoma DI-C se obtuvieron mediante deleciones los minigenomas M39 y M33. Las letras y los números sobre el recuadro del genoma indican los genes virales. Debajo de las barras representando a los minigenomas DI-C, M39 y M33, la longitud de las regiones discontinuas se muestra en nucleótidos. La longitud total de los RNAs se muestra a la derecha del genoma y minigenomas. La región identificada como 2144 representa la secuencia del genoma desde la posición 1 a la 2.144 de TGEV. La barra clara, ancha, del minigenoma M33 representa a la secuencia entre las posiciones 12.195 y 12.762. Las barras claras y oscuras, estrechas, situadas en el extremo de la derecha, representan la secuencia comprendida entre las posiciones 28.087 y 28.586.

La Figura 4 ilustra el rescate y amplificación de los minigenomas M39-GUS-A1, -A2, -A3, -A4 y -8 generados y representa el esquema del procedimiento experimental utilizado, partiendo de células ST transfectadas con los plásmidos e infectadas con el virus TGEV (PO). Para amplificar los minigenomas se pasó el virus generado tres veces consecutivas en células ST confluentes (PI, P2 y P3). En el tercer pase se analizó el RNA viral en la célula y en los viriones purificados.

La Figura 5 pone de manifiesto la detección de los RNAs subgenómicos del virus TGEV mediante RT-PCR en células infectadas y muestra la electroforesis en gel de agarosa de los productos de las reacciones de RT-PCR específicas para la detección de cada uno de los RNAs subgenómicos del virus, indicados en la parte superior del gel. Las bandas minoritarias corresponden a productos no identificados de las reacciones de RT-PCR y probablemente corresponden a hibridaciones inespecíficas.

La Figura 6 ilustra el análisis de las preparaciones de virus TGEV purificados mediante tres procedimientos distintos: a) análisis por electroforesis SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata del virus TGEV concentrado por centrifugación a través de un colchón de sacarosa al 31% (gel de la izquierda) o b) por centrifugación a través de un gradiente continuo de sacarosa (gel del centro), o c) análisis por electroforesis SDS-PAGE y fluorografía de virus TGEV marcado radiactivamente y purificado por inmunocaptura (gel de la derecha). Las flechas indican las posiciones de las proteínas estructurales mayoritarias. *, proteínas contaminantes.

La Figura 7 ilustra la detección de los mRNAs del virus TGEV por RT-PCR en viriones purificados y muestra la electroforesis en gel de agarosa de los productos de las reacciones de

RT-PCR obtenidos para la detección de los mRNAs que se indican en la parte superior de los geles, en virus concentrado (A), virus purificado por gradiente de sacarosa (B), virus purificado por inmunocaptura (C) y virus purificado por inmunocaptura con 15 lavados con tampón PES-ESA solo o incluyendo las concentraciones del detergente no iónico Tween-20 que se indican (D).

La Figura 8 ilustra la detección del genoma, minigenoma M39-GUS y mRNA-GUS en células ST, infectadas con un inóculo de virus TGEV que contenía el minigenoma M39-GUS, y en viriones purificados. La Figura 8A muestra el esquema del minigenoma M39-GUS (barra superior) y del mRNA codificado por éste (barra inferior) detectados por RT-PCR con los oligonucleótidos utilizados indicados sobre cada barra. La secuencia líder se muestra en los extremos 5' (L). A la derecha se indica si los RNAs se replican (REP +) y encapsidan (ENC +). La Figura 8B muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de los productos de las reacciones de RT-PCR específicas para la detección del genoma (G), minigenoma (Mi) y mRNA-GUS (mRNA). Los tamaños de los productos se muestran a la derecha del gel.

La Figura 9 representa esquemáticamente las secuencias potencialmente implicadas en el rescate eficiente del minigenoma M33. En el esquema mostrado en la Figura 9A se representa el RNA genómico del virus TGEV y el RNA DI-C generado a partir de éste. La estructura del minigenoma M33 se compara con la del RNA del minigenoma DI-C. A, región del extremo 5' del genoma del virus; B, región procedente de la secuencia solapante entre las ORFs la y lab. Cada una de las regiones del minigenoma DI-C está sombreada indicando su procedencia dentro del genoma del virus. La Figura 1B representa esquemáticamente el minigenoma M33 con las regiones A y B señaladas. Las subdivisiones de cada región se esquematizan como barras. Los números indican posiciones del genoma.

La Figura 10 muestra esquemáticamente la inserción de las secuencias del extremo 5' del minigenoma M33 en mRNAs mensajeros derivados del minigenoma M39-GUS. El esquema superior representa el minigenoma M39-GUS en el que se ha insertado un módulo de expresión compuesto por una IRS optimizada, las secuencias insertadas (Ai o B) y el gen *gus*. El esquema inferior representa la transfección de las construcciones generadas, su rescate y amplificación por pases sucesivos en células infectadas con el virus TGEV (PO a P3). El RNA de las células y los viriones se purificó en el pase 3.

La Figura 11 muestra los resultados del análisis por RT-PCR de los RNAs amplificados en células infectadas en presencia de minigenomas que incluyeron las secuencias A1, A2, A3,

A4 y B. En el gel superior se muestran los productos de las reacciones de RT-PCR específicas para la detección del genoma (O), minigenomas (Mi) y mRNAs (mR) en las células infectadas. En el gel inferior se muestran los productos de las reacciones de RT-PCR específicas detectados en viriones purificados, correspondientes a los análisis mostrados en el gel superior. La
5 amplificación por PCR de los mRNAs y minigenomas se realizó con el oligonucleótido OUS 297, que no hibridaba con el genoma del virus.

La Figura 12 ilustra la localización de la señal de encapsidación en el genoma del virus TGEV. Se representa esquemáticamente el genoma del virus TGEV incluyendo las distintas ORFs del virus. La posición de las señales de encapsidación de los coronavirus TGEV, MHV y
10 BCoV se indican con una flecha. La posición aproximada de las señales de encapsidación en el genoma del virus se muestra debajo del genoma. ES, señal de encapsidación.

La Figura 13 ilustra esquemáticamente la relocalización de la señal de encapsidación en el genoma del virus TGEV. En el esquema superior se representa el genoma del virus TGEV con las ORFs E y N delecionadas (ΔE y ΔN). Se representan las distintas ORFs del virus y la
15 señal de encapsidación (ES). La flecha indica la relocalización de la ES desde el extremo 5' al extremo 3', resultando en un nuevo genoma con la señal de encapsidación localizada en la posición de la ORF E delecionada (esquema inferior). UTR, región no traducible.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 En un aspecto, la invención proporciona una secuencia, aislada, de ácido nucleico, en adelante secuencia de ácido nucleico de la invención, seleccionada entre:

- a) una secuencia de nucleótidos que comprende desde el nucleótido 100 al nucleótido 649 del genoma de un coronavirus del grupo 1, incluyendo dicha
25 secuencia de nucleótidos la secuencia de encapsidación (SE) de dicho coronavirus;
- b) una secuencia de ácido nucleico análoga a la secuencia definida en a) que contiene la secuencia de encapsidación (SE) de un coronavirus del grupo 1;
- c) una secuencia de ácido nucleico complementaria a cualquiera de dichas secuencias a) o b); y
- 30 d) una secuencia de un ácido nucleico con una estructura secundaria similar a la de una secuencia de encapsidación (SE) de un coronavirus del grupo 1, independientemente de la secuencia de nucleótidos.

El término “ácido nucleico” tal como se utiliza en esta descripción incluye cualquier molécula de DNA o RNA.

Asimismo, en el sentido utilizado en esta descripción, el término “coronavirus del grupo 1” incluye coronavirus porcinos, tales como TGEV, el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV); caninos, por ejemplo el coronavirus canino (CCoV); felinos, por ejemplo, el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV); humanos (HCoV-229E); y, otros coronavirus estrechamente relacionados con ellos en su secuencia.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir a cualquier secuencia de ácido nucleico que tenga un elevado porcentaje, igual o superior al 40%, de nucleótidos idénticos o que presente la misma característica técnica de la secuencia definida en a), es decir, que contiene la SE de un coronavirus de grupo 1. Dicha secuencia de ácido nucleico análoga puede contener sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, o bien puede contener uno o más nucleótidos adicionales en cualquiera de sus extremos, o bien puede presentar una o más deleciones, siempre y cuando se mantenga la SE del coronavirus del grupo 1. En general, dicha secuencia de ácido nucleico análoga definida en b) es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos definida en a). En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 80%, o más preferentemente de, al menos, un 95%. En una realización particular, la secuencia de ácido nucleico análoga a la secuencia definida en a) [secuencia b)] es un fragmento de dicha secuencia de nucleótidos definida en a) que incluye la SE del coronavirus del grupo 1.

La invención también incluye secuencias de ácido nucleico complementarias a las secuencias de ácido nucleico identificadas como a) o b), así como secuencias de ácidos nucleicos, en particular RNA, con estructuras secundarias similares a las de, al menos, una SE de un coronavirus del grupo 1, independientemente de la secuencia de nucleótidos. Estas secuencias secundarias fueron previstas utilizando el programa informático M-fold (Zucker, 1989a y b) y su existencia fue comprobada por métodos genéticos, enzimáticos y químicos.

En una realización particular, la secuencia de ácido nucleico de la invención comprende, o está constituida por, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1. La secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1 corresponde a la secuencia de nucleótidos comprendida entre el nucleótido 100 y el nucleótido 649 del cDNA del genoma del virus

TGEV, en concreto del aislado PUR-46 MAD, un aislado representativo de TGEV, cuya secuencia completa se describe en la solicitud de patente española P9902673, y contiene la SE de dicho virus. En otra realización particular, la secuencia de ácido nucleico de la invención comprende un fragmento de dicha SEC. ID. N°: 1 que contiene la SE del virus TGEV.

5 La localización de la SE del virus TGEV entre los nucleótidos 100 y 649 del genoma del virus ha resultado sorprendente, entre otras cosas porque la SE en el coronavirus MHV se ha situado a 1,4 kb del extremo 3' del gen de la replicasa (Fosmire y cols., 1992), es decir, una zona que está a casi 20.000 nt de la descrita aquí para la SE en el genoma del virus TGEV.

10 La secuencia de ácido nucleico de la invención puede proceder de cualquier organismo que la contenga de forma natural, por ejemplo, un coronavirus del grupo 1, o de un organismo hospedador transformado con dicha secuencia de ácido nucleico, o, en general, de cualquier organismo que la contenga. Por tanto, la secuencia de ácido nucleico de la invención puede obtenerse utilizando métodos convencionales, por ejemplo, mediante técnicas de aislamiento e identificación de ácidos nucleicos a partir de cualquier organismo que la contenga o de un
15 organismo hospedador transformado con dicha secuencia de ácido nucleico, mediante el empleo de sondas u oligonucleótidos preparados a partir de la información sobre la secuencia de nucleótidos proporcionada por esta invención.

Una característica esencial de la secuencia de ácido nucleico de la invención radica en que dicha secuencia incluye la SE de un coronavirus del grupo 1. La identificación de la SE del
20 genoma permite, entre otras cosas, el estudio de los mecanismos de encapsidación de coronavirus y la generación de nuevos vectores virales bioseguros para el diseño de nuevas vacunas y para terapia génica, aplicables en salud animal y humana. La localización de la SE del genoma tiene una gran importancia práctica, además de científica, y puede utilizarse, por ejemplo, en el desarrollo de vectores útiles con fines vacunales o destinados a terapia génica
25 derivados de dichos coronavirus del grupo 1.

En otro aspecto, la invención proporciona un vector que comprende
una secuencia de ácido nucleico (I) seleccionada entre (i) una secuencia de ácido nucleico correspondiente al genoma completo, o a una parte del mismo, de un coronavirus del grupo 1, y (ii) una secuencia de ácido nucleico de otro virus que tiene una identidad de
30 secuencia igual o superior al 60% con dicha secuencia (i); a la que se le ha delecionado, al menos, un gen esencial para el ensamblaje de dicho virus, y
una secuencia de ácido nucleico de la invención.

En una realización particular, dicha secuencia de ácido nucleico de la invención se ha relocalizado en una posición distinta a la original (es decir, en una posición distinta a la posición en la que habitualmente se encuentra en el virus tipo salvaje), por ejemplo, en una posición adyacente al, o inmediatamente al lado del, gen deletado o de uno de los genes deletados, dando lugar, de este modo, a un vector bioseguro, es decir, que podría regenerar un virus competente en replicación y propagación por recombinación con otro virus circulante con una frecuencia igual o inferior a 10^{-10} . Por tanto, un vector como el proporcionado por esta invención presenta un elevado nivel de bioseguridad ya que la frecuencia de regeneración de virus infectivo a partir de una recombinación entre el vector y un virus de campo es muy baja [véase el Ejemplo, apartado "3. Discusión"].

En una realización particular, el vector proporcionado por esta invención es un vector viral derivado de un coronavirus del grupo 1, por ejemplo, TGEV, que comprende una secuencia de ácido nucleico correspondiente al genoma de dicho coronavirus del grupo 1, o un fragmento del mismo, al que se le ha deletado, al menos, un gen esencial para el ensamblaje de dicho coronavirus y en el que la secuencia de ácido nucleico de la invención se ha localizado en una posición distinta a la original, por ejemplo, en una posición adyacente al, o inmediatamente al lado del, gen deletado o de uno de los genes deletados.

En otro aspecto, la invención proporciona una construcción de un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de la invención junto con, opcionalmente, una secuencia promotora de la transcripción. Dicha construcción puede encontrarse en un RNA o en una copia cDNA de un plásmido o vector que posee un origen de replicación y es, por tanto, potencialmente capaz de replicarse en una célula adecuada. El ensamblaje de los elementos reguladores de la transcripción, así como la introducción de dicha construcción en un plásmido, puede realizarse mediante técnicas convencionales [Sambrook et al., 1989]. Dicha construcción de ácido nucleico proporcionada por esta invención así como los plásmidos que la codifican, constituyen objetos adicionales de esta invención.

A partir del vector proporcionado por esta invención se pueden transformar células apropiadas y recuperar los viriones obtenidos que contienen la construcción proporcionada por esta invención. Por tanto, la invención proporciona, además, un método para producir un coronavirus recombinante que comprende la introducción de un vector proporcionado por esta invención en una célula hospedadora, el cultivo de dicha célula bajo condiciones que permiten la expresión y replicación del vector viral y la recuperación de los viriones obtenidos. La

introducción del vector de la invención en la célula hospedadora puede realizarse por métodos convencionales. Dichas células hospedadoras que contienen el vector de la invención constituyen un objeto adicional de la presente invención.

Adicionalmente, el vector proporcionado por esta invención se puede manipular por técnicas de ingeniería genética convencionales para insertar, al menos, una secuencia de un ácido nucleico heterólogo, que codifica una determinada actividad, bajo el control de los elementos reguladores de la transcripción presentes en dicho vector. Por tanto, en otra realización particular, el vector proporcionado por esta invención comprende, además, un ácido nucleico heterólogo bajo el control de los elementos reguladores de la transcripción presentes en dicho vector para permitir la expresión de dicho ácido nucleico heterólogo.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “heterólogo” aplicado a un ácido nucleico se refiere a una secuencia de ácido nucleico que no está presente normalmente en el vector empleado para introducir el ácido nucleico heterólogo en una célula hospedadora.

El ácido nucleico heterólogo que puede contener el vector viral de la invención puede ser un gen, o un fragmento del mismo, que codifica una proteína, un péptido, un epítipo o cualquier producto génico de interés (por ejemplo, anticuerpos, enzimas, etc). El ácido nucleico heterólogo se puede insertar en el vector de la invención mediante técnicas de ingeniería genética convencionales en cualquier región apropiada del cDNA, por ejemplo, después del codon iniciador de la traducción de un gen que codifica para una proteína de un coronavirus del grupo 1 y en fase de lectura con ese gen.

El vector de la invención puede expresar una o más actividades. En este último caso, el vector viral incluirá tantas secuencias de ácido nucleico heterólogo como actividades se van a expresar precedidas de uno o varios promotores, o bien de un promotor y varios sitios de reconocimiento del ribosoma (IRES), o bien de varios promotores y un sitio de reconocimiento del ribosoma.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir un producto de interés que comprende cultivar una célula hospedadora que contiene un vector viral de la invención bajo condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico heterólogo y recuperar el producto de interés. Dichas células hospedadoras que contienen el vector viral de la invención constituyen un objeto adicional de la presente invención.

El vector viral de la invención puede ser diseñado de forma que se pueda controlar fácilmente su especificidad de especie y su tropismo. Debido a estas características, una

aplicación muy interesante de los vectores virales de la invención es su empleo en terapia génica como vector del gen de interés o como vector vacunal para inducir respuestas inmunes frente a diferentes patógenos.

La invención proporciona, además, vacunas capaces de inducir protección en un animal frente a la infección causada por un agente infeccioso que comprende (i) al menos, un vector viral de la invención que expresa, al menos, un antígeno adecuado para inducir una respuesta inmune frente a dicho agente infeccioso, o un anticuerpo que proporciona protección contra dicho agente infeccioso, junto con, opcionalmente, (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Por “inducir protección”, en el sentido utilizado en esta descripción, debe entenderse la respuesta inmune del organismo receptor (animal a inmunizar) inducida por el vector viral de la invención, a través de los mecanismos adecuados tales como los inducidos por sustancias potenciadoras de la respuesta celular (interleuquinas, interferones, etc.), factores de necrosis celulares y sustancias similares que hacen que el animal quede protegido frente a infecciones causadas por agentes infecciosos.

El término “animal” incluye a cualquier animal, de cualquier especie, preferentemente mamíferos, incluido el hombre.

El término “agente infeccioso”, en el sentido utilizado en esta descripción incluye a cualquier agente infeccioso viral, bacteriano, fúngico, parasitario, u otros que puedan infectar a un animal y ocasionarle una patología.

En una realización particular, la vacuna proporcionada por esta invención comprende al menos un vector viral de la invención que expresa, al menos, un antígeno capaz de inducir una respuesta inmune sistémica y/o una respuesta inmune en mucosas frente a distintos agentes infecciosos que se propagan en mucosas respiratorias o entéricas. Los vectores objeto de la invención son adecuados para inducir inmunidad en mucosas así como inmunidad lactogénica, de especial interés en la protección de neonatos frente a infecciones del tracto intestinal.

En otra realización particular, la vacuna proporcionada por esta invención comprende, al menos, un vector viral de la invención que expresa, al menos, un gen que codifica para las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG₁, IgA, etc.) que proporciona protección contra un agente infeccioso.

La especificidad de especie se puede controlar de forma que el vector viral exprese la proteína S de la envuelta, de un coronavirus que infecta la especie deseada (humana, canina,

felina, porcina, etc.), adecuada para ser reconocido por los receptores celulares de la especie correspondiente.

Las vacunas proporcionadas por esta invención pueden ser monovalentes o multivalentes dependiendo de si los vectores virales de la invención expresan uno o más
5 antígenos capaces de inducir una respuesta inmune frente a uno o más agentes infecciosos o bien uno o más anticuerpos que proporcionan protección contra uno o más agentes infecciosos.

En una realización particular de esta invención se proporcionan vacunas monovalentes capaces de proteger al hombre, cerdos, perros y gatos contra distintos agentes infecciosos humanos, porcinos, caninos y felinos, y el tropismo se controla expresando la glicoproteína S
10 del coronavirus con la especificidad de especie deseada.

Las vacunas monovalentes contra agentes infecciosos humanos pueden contener un vector que exprese un antígeno seleccionado del grupo esencialmente constituido por antígenos de patógenos humanos, especialmente agentes infecciosos humanos seleccionados entre aquellos causantes de infecciones de mucosas entéricas y/o respiratorias o bien cuya vía de
15 entrada sea a través de dichas mucosas, por ejemplo, coronavirus humanos, rinovirus humanos, rotavirus humanos, enterovirus humanos, virus de la gripe, y, en general, cualquier patógeno infeccioso, incluyendo virus y bacterias, que infectan a humanos.

Las vacunas monovalentes contra agentes infecciosos porcinos pueden contener un vector que exprese un antígeno seleccionado del grupo esencialmente constituido por antígenos de los siguientes patógenos porcinos: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*,
20 *Haemophilus parasuis*, *Parvovirus porcino*, *Leptospira*, *Escherichia coli*, *Erysipelotrix rhusiopathiae*, *Pasterella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Clostridium sp.*, *Serpulina hydiosenteriae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, PEDV, coronavirus respiratorio porcino, rotavirus, virus de la fiebre aftosa (FMDV), o contra los patógenos causantes del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, la enfermedad de Aujeszky (Pseudorabies), influenza porcina o gastroenteritis transmisible y el agente etiológico de la rinitis atrófica y de la ileitis proliferativa.

Las vacunas monovalentes contra agentes infecciosos caninos pueden contener un vector de expresión que exprese un antígeno seleccionado del grupo esencialmente constituido por antígenos de los siguientes patógenos caninos: herpesvirus caninos, adenovirus canino tipos
30 1 y 2, parvovirus canino tipos 1 y 2, reovirus canino, rotavirus canino, coronavirus canino, virus de la parainfluenza canina, virus de la influenza canina, virus del moquillo (Distemper virus),

virus de la rabia, retrovirus y calicivirus canino.

Las vacunas monovalentes contra agentes infecciosos felinos pueden contener un vector de expresión que exprese un antígeno seleccionado del grupo esencialmente constituido por antígenos de los siguientes patógenos felinos: calicivirus del gato, virus de la inmunodeficiencia
5 felina, herpesvirus felinos, virus de la panleucopenia felina, reovirus felino, rotavirus felino, coronavirus felino, virus de la peritonitis infecciosa del gato, virus de la rabia, *Chlamydia psittaci* felina, y virus de la leucemia felina.

Los vectores de la invención pueden expresar un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso, por ejemplo, un agente infeccioso porcino, canino o felino como
10 los citados previamente. En una realización particular, el vector expresa el anticuerpo monoclonal recombinante identificado como 6A.C3 que neutraliza el virus TGEV, expresado con isotipos IgG₁ o IgA en el que la parte constante de la inmunoglobulina es de origen porcino o anticuerpos neutralizantes para rotavirus humanos y porcinos.

Como excipiente puede utilizarse un diluyente tal como suero salino fisiológico u otras
15 soluciones salinas similares. Asimismo, estas vacunas pueden contener también un adyuvante de los habitualmente utilizados en la formulación de vacunas, tanto acuoso, tal como hidróxido de aluminio, QuilA, suspensiones de geles de alúmina y similares, como oleoso, a base de aceites minerales, glicéridos y derivados de ácido graso, y sus mezclas.

Estas vacunas también pueden contener sustancias potenciadoras de la respuesta celular
20 (PRC), es decir, sustancias potenciadoras de subpoblaciones de células T helper (Th₁ y Th₂) tales como interleuquina-1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, g-IFN (interferón gamma), factor de necrosis celular y sustancias similares, que podrían, teóricamente, provocar inmunidad celular en los animales vacunados. Estas sustancias PRC podrían utilizarse en formulaciones vacunales con adyuvantes acuosos u oleosos. También pueden utilizarse otro tipo de adyuvantes
25 que modulan e inmunoestimulan la respuesta celular tales como el MDP (muramil dipéptido), ISCOM (Immuno Stimulant Complex) o liposomas.

La invención proporciona vacunas multivalentes capaces de prevenir y proteger animales de las infecciones causadas por distintos agentes infecciosos. Estas vacunas multivalentes pueden elaborarse a partir de vectores virales de la invención en los que se han
30 insertado las distintas secuencias que codifican los antígenos correspondientes en el mismo vector recombinante o bien construyendo vectores recombinantes independientes que posteriormente se mezclarían para su inoculación conjunta. Por tanto, estas vacunas

multivalentes comprenden un vector viral que contiene más de una secuencia de ácidos nucleicos heterólogos que codifican para más de un antígeno o, alternativamente, distintos vectores virales que expresan, cada uno de ellos, al menos un antígeno distinto.

Análogamente, se pueden preparar vacunas multivalentes que comprenden vectores multivalentes utilizando secuencias que codifican anticuerpos que proporcionan protección contra agentes infecciosos en lugar de secuencias que codifican los antígenos.

En una realización particular de esta invención se proporcionan vacunas capaces de conferir inmunidad a hombres, cerdos, perros y gatos contra distintos agentes infecciosos humanos, porcinos, caninos y felinos, respectivamente. Para ello, los vectores virales contenidos en la vacuna deben expresar distintos antígenos de los patógenos humanos, porcinos, caninos o felinos previamente mencionados.

Las vacunas de esta invención pueden presentarse en forma líquida o liofilizada y pueden prepararse suspendiendo los sistemas recombinantes en el excipiente. Si dichos sistemas estuvieran en forma liofilizada, el propio excipiente podría ser el reconstituyente.

Alternativamente, las vacunas proporcionadas por esta invención se pueden utilizar en combinación con otras vacunas convencionales, ya sea formando parte de las mismas o bien como diluyente o fracción liofilizada para diluirse con otras vacunas ya sean convencionales o recombinantes.

Las vacunas proporcionadas por esta invención pueden administrarse al animal por vía oral, nasal, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intramuscular o por medio de aerosol.

Una característica propia de las vacunas proporcionadas por esta invención es su elevado nivel de bioseguridad, derivado del hecho de que se parte de vectores derivados de genomas virales a los que se les ha delecionado un gen esencial para el ensamblaje del virus y en los que se ha relocalizado la SE en posición adyacente o al lado del gen delecionado con lo que el riesgo de que se recupere el virus salvaje por recombinación es prácticamente inexistente.

La invención también proporciona un método para la inmunización de animales, en particular, hombres, cerdos, perros y gatos, contra uno o varios agentes infecciosos de forma simultánea, que comprende la administración por vía oral, nasal, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intramuscular o por medio de aerosol (o formas combinadas de éstas) de una vacuna que contiene una cantidad inmunológicamente eficaz de un sistema recombinante proporcionado por esta invención.

Adicionalmente, la invención también proporciona un método para proteger a los animales recién nacidos contra agentes infecciosos que infectan a dichos animales, que consiste en la administración por vía oral, nasal, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intramuscular o por medio de aerosol (o formas combinadas de éstas) a las madres antes de o durante el periodo de gestación, o a su progenie, una vacuna de las proporcionadas por esta invención.

La invención se ilustra mediante el siguiente ejemplo que describe la identificación de una región del genoma de TGEV que contiene la SE de dicho coronavirus. Este ejemplo no debe ser considerado como limitativo del alcance de la invención sino como ilustrativo de la misma.

EJEMPLOS

Para la realización del Ejemplo 1 que se describe de forma detallada más adelante, se han utilizado, con carácter general, los Materiales y Métodos que se describen a continuación.

Materiales y Métodos

1. Células eucarióticas

1.1 Líneas celulares

Las células utilizadas para el crecimiento, titulación y purificación del virus TGEV fueron las células ST (*swine testicle cells*), una línea celular obtenida a partir de células epiteliales de testículo de cerdo embrionario (McClurkin y Norman, 1966). Estas células se obtuvieron de L. Kemeny (National Animal Disease Center, Ames Iowa, EE.UU.).

1.2 Crecimiento de las células eucariotas

Las células ST se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con suero fetal de ternera (SFT) al 10% (GIBCO-BRL), 50 mg/ml de gentamicina, glutamina 2 mM y aminoácidos no esenciales al 1%.

1.3 Marcaje metabólico con ³⁵S-metionina/cisteína

Para la producción de virus marcado con ³⁵S-metionina/cisteína las células se crecieron en monocapas en placas de cultivo de 60 mm de diámetro (Nunc). La monocapa se lavó dos veces con DMEM sin metionina/cisteína y se añadieron 100 µCi de [³⁵S]-metionina/cisteína (Pro-mix L-[³⁵S]- *in vitro cell labeling mix*, Amersham Pharmacia Biotech) en el medio de cultivo. La infección con el virus TGEV se llevó a cabo posteriormente al marcaje metabólico a 37 °C durante 15-18 h.

2. Virus

2.1 Virus utilizados

El virus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV) utilizado pertenece al conjunto de aislados Purdue y se obtuvieron en Indiana en 1946 (Doyle y Hutchings, 1946). El virus se adaptó a crecer en cultivos celulares (Haelterman y Pensaert, 1967) y fue cedido por E. H. Bohl (Ohio State University, Wooster, Ohio, Estados Unidos). Este aislado del virus TGEV se había pasado 115 veces en células ST, y fue clonado cinco veces consecutivas en el laboratorio de los inventores. El clon seleccionado se denominó PUR46-CC120-MAD, abreviadamente PUR46-MAD (Sánchez y cols., 1990). Este es un virus atenuado que crece bien en cultivos celulares proporcionando títulos comprendidos entre 10^8 y 10^9 ufp/ml.

En los experimentos de encapsidación se utilizaron inóculos de virus TGEV con partículas defectivas que llevaban el minigenoma M39-GUS encapsidado. La construcción del minigenoma y la producción de los inóculos se ha descrito anteriormente (Alonso y cols., 2002; Izeta y cols., 1999).

2.2 Crecimiento y purificación del virus TGEV

El virus TGEV se purificó siguiendo dos metodologías distintas. El primer protocolo de purificación se basó en un método dependiente de su densidad por centrifugación a través de gradientes de sacarosa. El segundo método se basó en la captura del virus con anticuerpos monoclonales (Acms) específicos frente a las proteínas de membrana (inmunocaptura o inmunopurificación). En el primer método, las células ST se crecieron en monocapas en botellas rotatorias de 500 cm² de superficie de cultivo, obteniéndose 100 millones de células por botella. Las células se infectaron con inóculos del virus TGEV con una multiplicidad de infección (mdi) de 5 unidades formadoras de placa (ufp) por célula. Los sobrenadantes de las células infectadas se recogieron a las 42 h y se clarificaron por centrifugación en el rotor GSA de SORVALL a 6.000 rpm durante 20 min a 4°C. El virus del sobrenadante clarificado se sedimentó por ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa al 31% en tampón TEN (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1 M, pH 7,4) en el rotor SW60.Ti de Beckmann, a 27.000 rpm durante 1 h a 4°C. El virus sedimentado se resuspendió en tampón TEN con Tween-20 al 0,05% y se centrifugó a través de un gradiente continuo de sacarosa del 30% al 42% en tampón TEN, a 27.000 rpm en el rotor SW60.Ti de Beckmann durante 2 h a 4°C. El gradiente se fraccionó desde el fondo y las fracciones que contenían virus se identificaron por absorbancia de luz ultravioleta (260 nm). Estas fracciones se diluyeron con tampón TEN. A continuación,

los viriones se sedimentaron por ultracentrifugación a 27.000 rpm durante 1 h y se resuspendieron en tampón TNE (Tris-HCl, 10 mM, pH 7,4, EDTA, 1 mM and NaCl, 100 mM), hasta una concentración de 1 µg/µl. La pureza del virus se estableció mediante electroforesis SDS-PAGE visualizando las proteínas del virus por tinción con nitrato de plata.

5 En el segundo método, los sobrenadantes obtenidos a partir de células infectadas, marcadas o sin marcar metabólicamente, se recuperaron y clarificaron por centrifugación a baja velocidad en una microfuga (3.000 rpm durante 5 minutos). Los viriones se concentraron 100 veces por ultracentrifugación a 27.000 rpm a 4°C durante 50 minutos en el rotor SW60.Ti de Beckmann, a través de un colchón de sacarosa al 30% en tampón TNE. El sobrenadante se
10 retiró mediante aspiración con bomba de vacío y los viriones se resuspendieron en 30-40 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los viriones recuperados se analizaron por transferencia e inmunodetección con anticuerpos monoclonales, o por autorradiografía. A continuación se fijó proteína A (Amersham Pharmacia Biotech) en placas de vinilo de 96 pocillos (5 µg en 100 µl de tampón PBS por pocillo) (Data Packaging Corporation) por
15 incubación durante 2 h a 37°C. Los sitios activos de la placa se bloquearon con 120 µl de tampón PBS-BSA al 5% durante 2 h a 37°C. El tampón de bloqueo se retiró, se lavaron los pocillos dos veces con 120 µl de PBS-BSA al 0,1% y se añadió anticuerpo monoclonal (Acm) de conejo anti-ratón (10 µg/pocillo). Los anticuerpos se incubaron durante 1 h a 37 °C. Los pocillos se lavaron dos veces con 120 µl de tampón PBS-BSA al 0.1% y se añadieron los
20 anticuerpos monoclonales (Acms) específicos frente a las proteínas estructurales N y M del virus TGEV (6 µg de anticuerpos por pocillo, en un volumen final de 60 µl en PBS-BSA al 0,1%), durante 1 h a 37°C. Los pocillos se lavaron dos veces con tampón PBS-BSA al 0,1% y se añadieron los viriones concentrados (unos 5 µg en 30 µl) durante 12 h a 4°C. Los pocillos se lavaron entre 10 y 15 veces y los viriones inmunopurificados se procesaron dependiendo del
25 tipo de análisis (véase más adelante).

2. 3 Purificación de las cápsidas y nucleocápsidas del virus TGEV

Las cápsidas del virus se obtuvieron a partir de 100 o 300 µg de virus purificado, disolviendo las membranas virales con el detergente no iónico NP-40 a una concentración final del 1%, en una solución tampón compuesta de 100 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, pH 8
30 (tampón BD), en un volumen final de 500 µl. La disolución de las envueltas lipídicas se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 15 ó 30 minutos, en agitación. Las cápsidas se purificaron por ultracentrifugación a través de un gradiente continuo de sacarosa del 15% al 45% en

tampón BD, o por sedimentación a través de un colchón de sacarosa al 25%, en el rotor SW60.Ti de Beckmann, a 27.000 rpm durante 50 minutos a 4°C. El gradiente se fraccionó desde el fondo y las fracciones que contenían las cápsidas se identificaron por electroforesis SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata. Las fracciones con cápsidas se identificaron y visualizaron por microscopía electrónica y se diluyeron en tampón BD. Las cápsidas se sedimentaron por ultracentrifugación a 27.000 rpm durante 50 minutos a 4°C en el rotor SW60.Ti de Beckmann, y se resuspendieron en tampón de unión (BU; 10 mM HEPES pH 7,4, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 10% glicerol, y 0,1 mM EDTA) (Homann y cols., 1991) hasta alcanzar una concentración final en proteína de 1 µg/µl. La pureza de las cápsidas se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata.

Las nucleocápsidas se obtuvieron a partir de 100 µg de cápsidas purificadas desensambladas por tratamientos con KCl 400 mM en tampón BD, en un volumen final de 400 µl. Las nucleocápsidas se sedimentaron por ultracentrifugación a 27.000 rpm durante 50 minutos a 4°C en el rotor SW60.Ti de Beckmann, a través de un colchón de sacarosa al 22% en tampón BD. El sobrenadante se eliminó y las nucleocápsidas se resuspendieron en 50 µl de tampón BU hasta alcanzar una concentración final en proteína de 1 µg/µl.

3. Bacterias

3.1 Cepas bacterianas

Para la clonación de plásmidos se utilizó la cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene) (Bullock y cols., 1987), que contiene un episoma F' con el gen de resistencia a tetraciclina y una porción del gen de la β-galactosidasa. El genotipo de esta cepa bacteriana es: *endA1 hsdR17 (r_k-, m_k-) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Δ(lac) [F' proAB lacI_Z_M15 Tn10(tet^R)]*.

3.2 Preparación de bacterias competentes

Para la amplificación y producción de bacterias *E. coli* XL1-Blue competentes para la electroporación, éstas se crecieron en medio suplementado con tetraciclina a una concentración de 20 µg/ml. Se inocularon 10 ml de medio SB (triptona 30 g/l, extracto de levadura 20 g/l, MOPS 10 g/l) con glucosa 20 mM, con una colonia procedente de una placa fresca y las bacterias se incubaron durante 12 h a 37°C y en agitación. Con 2 ml de este cultivo se inoculó 1 l de medio SB suplementado con glucosa 2 M y las bacterias se crecieron a 37°C hasta alcanzar

una densidad óptica a 600 nm comprendida entre 0,8 y 0,9 unidades de absorbancia. El cultivo se enfrió en hielo durante 20 minutos y las bacterias se centrifugaron en el rotor GSA de SORVALL a 4.000 g durante 15 minutos a 4°C. Las bacterias se resuspendieron en frío en 1 l de glicerol al 10%. Las bacterias se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en 500 ml de glicerol al 10%. Las bacterias se sedimentaron y se resuspendieron en 250 ml de glicerol al 10%. Finalmente, las bacterias se centrifugaron y se resuspendieron en 3 ml de glicerol al 10%. Las bacterias se repartieron en alícuotas de 100 µl y se guardaron a -70°C hasta su uso para electroporación. La eficiencia de transformación de las bacterias se calculó electroporando un plásmido pBluescript de concentración conocida como referencia, y fue reproduciblemente en torno a 10⁹ colonias/µg de DNA.

3.3 Transformación de bacterias por electroporación de plásmidos

Se utilizaron 50 µl de bacterias competentes para la transformación. Se añadió 1 µl de cada reacción de ligación, ó 10 ng de plásmido purificado a las bacterias y se incubó en hielo durante 1 minuto. A continuación, las bacterias con los plásmidos se transfirieron a cubetas de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad), y se transformaron mediante un pulso eléctrico de 2,5 kV, 25 µF y 200 en un electroporador "GenePulser" (Bio-Rad). A continuación, se añadió 1 ml de medio LB frío y las bacterias se incubaron a 37°C en agitación durante 1 h. Entre 50 y 100 µl de la suspensión de bacterias transformadas se sembraron en placas de petri con LB (medio Luria-Bertani) en medio sólido (15 g/l de agar) suplementado con ampicilina (100 µg/ml). Las bacterias se crecieron durante 16 horas a 37°C.

Para la producción y purificación de plásmidos, las bacterias transformadas con plásmidos que conferían resistencia a ampicilina se crecieron a partir de una colonia aislada en placa, en medio líquido LB suplementado con ampicilina a 100 µg/ml.

4. Plásmidos

4.1 Plásmidos de clonaje de productos de PCR

Para el clonaje de productos de PCR se utilizó el plásmido pGEMT (Promega). Este plásmido contiene los promotores de los bacteriófagos T7 y SP6 separados por el gen LacZ interrumpido por dos secuencias protuberantes T entre las cuales se sitúa una secuencia de multiclonaje. Este plásmido confiere resistencia a ampicilina para su selección.

4.2 Plásmidos de expresión en células eucariotas

Para el clonaje y expresión de genes en células eucariotas se utilizó el plásmido

pcDNA3 (Invitrogen). Este plásmido contiene los promotores de genes inmediatamente tempranos de citomegalovirus (CMV) y T7 seguidos por una secuencia multiclonaje y la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH). Este plásmido confiere resistencia frente a los antibióticos ampicilina y geneticina, para su selección tanto en bacterias como en células eucariotas.

El plásmido pSL1190 (Pharmacia) se utilizó para el clonaje y expresión de minigenomas derivados del virus TGEV bajo el control del promotor de CMV (Alonso y cols., 2002; Izeta y cols., 1999).

5. Manipulación de DNA

5.1 Enzimas de restricción y clonaje

Para la manipulación y clonaje de DNA las enzimas de restricción *Bam*HI, *Nde*I, *Sal*I, *Apa*I y *Cla*I se adquirieron de Boehringer Mannheim o de New England Biolabs. Para la desfosforilación de los extremos de DNA se utilizó la fosfatasa alcalina de gamba (SAP) (USB).

Para la ligación de DNA, se empleó la DNA ligasa del fago T4 (New England Biolabs). Todos los tratamientos con enzimas de restricción, desfosforilación y ligación de DNA se hicieron siguiendo los protocolos previamente descritos (Sambrook y cols., 1989).

5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar DNA a partir de un molde, frecuentemente plásmidos, se utilizaron entre 50 y 100 ng de plásmido y se añadieron los oligonucleótidos correspondientes (10 μ M), deoxinucleótidos trifosfato (ATP, GTP, TTP y CTP) 0,25 mM, $MgCl_2$ 1,25 mM, tampón PCR (Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM) y 2,5 U de Taq DNA polimerasa (*Thermus aquaticus*) (Perkin Elmer), en un volumen final de 50 μ l. Las reacciones se realizaron en el termociclador GeneAmp PCR System 9600 de Perkin Elmer.

5.3 Separación de DNA por electroforesis en gel de agarosa

Para la separación de fragmentos de DNA se utilizaron geles de agarosa D-1 Media EEO (Pronadisa) al 1%, con bromuro de etidio (1 μ g/ml), en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM).

5.4 Purificación de DNA

Los plásmidos crecidos en bacterias en presencia de los antibióticos de selección se purificaron utilizando el sistema "CONCERTTM Rapid Plasmid Miniprep System" (Life Technologies) para la preparación de pequeñas cantidades de DNA plasmídico, y el sistema

“Qiafilter Midi-Plasmid Kit” (Qiagen) para preparaciones de cantidades intermedias de DNA plasmídico. El DNA obtenido a partir de geles de agarosa se purificó utilizando el sistema “QiaEx II Gel Extraction Kit” (Qiagen). La purificación de productos de PCR se realizó mediante el sistema “QIAquick PCR Purification Kit” (Qiagen). En todos los casos se siguieron las instrucciones proporcionadas por los proveedores.

6. Análisis del RNA

6.1 Extracción de RNA celular

Para el análisis del RNA producido en infecciones con el virus TGEV clon PUR46-MAD, se infectaron monocapas de células ST confluentes crecidas en placas de cultivos de 60 mm de diámetro (NUNC) con inóculos de virus a una mdi de 1. Las células se lisaron a las 12 hpi con 1 ml del reactivo ULTRASPECT siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial (Biotecx) basado en el método de fenolización ácida en presencia de isotiocianato de guanidina. El RNA se purificó y se resuspendió en 40 µl de agua tratada con DEPC y 20 unidades de inhibidor de RNAsa (Roche).

6.2 Extracción de RNA de viriones

Se utilizaron 10 µg de virus para el análisis del RNA encapsidado en viriones parcialmente y totalmente purificados por centrifugación a través de un colchón de sacarosa al 31% o en gradiente continuo de sacarosa, respectivamente. El RNA se extrajo con 100 µl del reactivo ULTRASPECT en presencia de 40 µg de RNA celular de levadura. El RNA se purificó siguiendo las instrucciones de la casa comercial y se resuspendió en 40 µl de agua DEPC con 20 unidades de inhibidor de RNAsas.

Para el análisis del RNA encapsidado en viriones purificados por inmunocaptura, una vez que los viriones se inmunocapturaron y se lavaron, se añadieron 10 µg de RNA de levadura por pocillo, para favorecer la precipitación del RNA viral, y se extrajo el RNA de los viriones con 100 µl del reactivo ULTRASPECT por pocillo. El RNA se purificó y se resuspendió como se ha descrito anteriormente.

6.3 Análisis por RT-PCR

Para la detección del RNA genómico y de cada uno de los RNAs subgenómicos del virus obteniendo DNA complementario se realizaron reacciones de transcripción inversa (RT), con oligonucleótidos específicos antisentido (-) que hibridaban con cada una de las ORFs de cada RNA subgenómico (Tabla 1). Las reacciones se realizaron en un volumen de 20 µl a 42°C durante

una hora, en presencia de deoxinucleótidos trifosfatos (ATP, GTP, TTP, CTP) 0,25 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 2,5 mM, tampón PCR y 6 unidades de transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) (Seikagaku).

Para la detección del minigenoma M39-GUS y del RNA subgenómico derivado del minigenoma M39-GUS, se utilizó el oligonucleótido GUS (5'-GACCCACACTTT GCCGTAATGAGTGACCGCA-3') que hibrida específicamente con el gen *gus* presente en el minigenoma y con su RNA mensajero, o el oligonucleótido GUS 297 (5'-GACCCACACTTTGCCGTAATGAG-3').

La amplificación del DNA se realizó mediante PCR utilizando como molde 10 µl de las reacciones de RT. Para la amplificación del RNA genómico se utilizó el oligonucleótido 1.7, que hibrida en las posiciones 1.660 y 1.676 del RNA genómico, o el oligonucleótido 1.8, que hibrida en las posiciones 1.849 y 1.870. Para la amplificación de los RNAs subgenómicos se emplearon cada uno de los oligonucleótidos antisentido descritos anteriormente junto con un oligonucleótido con la secuencia líder del virus TGEV (Oligonucleótido líder; 5'-AGATTTTGTCTTCGGACACCAACTCG-3'). El minigenoma M39-GUS se detectó utilizando el oligonucleótido antisentido GUS o GUS 297 junto con el oligonucleótido 19949, que hibrida entre las posiciones 3.228 y 3.245 en el minigenoma.

NO TENER EN CUENTA A LOS EFECTOS DE LA TRAMITACIÓN INTERNACIONAL

7. Análisis de proteínas

7.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Todas las muestras de proteínas se analizaron en geles del 10% de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (electroforesis SDS-PAGE) o en geles en gradiente lineal de poliacrilamida (5% al 15%) (Laemmli, 1970). Las proteínas se tiñeron en el gel con el reactivo “GelCode Blue stain” (PIERCE) o con nitrato de plata (Ansorge, 1985).

7.2 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa e inmunodetección con anticuerpos específicos (transferencia e inmunodetección, o transferencia tipo *Western*)

Para la detección de las proteínas por transferencia e inmunodetección, las proteínas separadas por electroforesis SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con un aparato de electrotransferencia Mini Protean II (Bio-Rad), a 150 mA durante 2 h en tampón de transferencia (25 mM Tris-192 mM glicina, 20% metanol, pH 8,3). Las membranas se bloquearon durante 2 h con un 5% de leche desnatada en polvo (Nestlé) en tampón TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con los Acms específicos para las proteínas S, N, M o β -glucuronidasa (GUS). El anticuerpo unido se detectó con anticuerpos de conejo específicos para inmunoglobulinas IgG de ratón o con anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo, conjugados con la peroxidasa de rábano, utilizando el sistema de quimioluminiscencia ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

7.3 Anticuerpos

La especificidad de los Acms 5B.H1, 9D.B4, 3D.E3, 3B.B3, 3D.C10, 25.22 y 1A6 se ha caracterizado previamente (Charley y Laude, 1988; Jiménez y cols., 1986; Laude y cols., 1992; Martín-Alonso y cols., 1992; Risco y cols., 1995; Suñé y cols., 1990; Wesley y cols., 1988; Woods y cols., 1987). Los Acms 9D.B4, 3B.B3 y 3D.E3 reconocen específicamente el extremo carboxilo de la proteína M del virus TGEV, y los Acms 25.22 y 1A6 son específicos para el extremo amino (Charley y Laude, 1988; Laude y cols., 1992; Wesley y cols., 1988; Woods y cols., 1987). Los Acms 3D.C10 y 5B.H1 reconocen las proteínas N y S del virus TGEV, respectivamente (Jiménez y cols., 1986; Martín-Alonso y cols., 1992). El antisuero de conejo específico para la proteína GUS se adquirió de la empresa 5 Prime → 3 Prime, Inc. La fracción F(ab)₂ de un anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a rodamina se adquirió de Cappel. El anticuerpo de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón utilizado en las inmunopurificaciones del virus TGEV se adquirió de Cappel.

8. Estimación de la relación molar entre las proteínas M y N en viriones y cápsidas purificadas

Virus y cápsidas purificadas (2 µg) se analizaron por electroforesis SDS-PAGE en gradiente de poliacrilamida (5% al 20%) y las proteínas estructurales se tiñeron con nitrato de plata. Las bandas de proteína se cuantificaron por densitometría utilizando el programa “Gel Documentation System 2000” (Biorad). Se utilizaron siete purificaciones independientes de virus para estimar la relación molar entre las proteínas M y N, tanto en viriones como en cápsidas. La distribución normal de la relación molar M/N se comprobó con el test de Chi-cuadrado (Martín Andrés y Luna del Castillo, 1994). La relación estequiométrica M/N entre los viriones y las cápsidas se comparó mediante el test no paramétrico t de Wilcoxon (Motulsky, 1995).

9. Unión directa de Acms a la superficie del virión TGEV

Para estudiar los dominios de la proteína M expuestos en la superficie del virus TGEV, se incubaron 50 µg de virus purificado con 5 µg de los Acms 25.22, 9D.B4 y 3D.E3, específicos para la proteína M, y el Acm 3D.C10, específico para la proteína N, en un volumen final de 500 µl de tampón TNE con Tween-20 al 0,05%, durante 2 h a 4°C. Los viriones se sedimentaron por ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa al 30% en tampón TNE con Tween-20 al 0,05%, a 27.000 rpm en el rotor SW60.Ti de Beckmann durante 1 h a 4°C. Los viriones se resuspendieron en 50 µl de tampón TNE. El virus TGEV se incubó con el Acm 3D.C10 en ausencia y en presencia del detergente NP-40 al 1%, como control de la integridad de la estructura del virus. Los virus con los Acms unidos a su superficie se analizaron por electroforesis SDS-PAGE y las cadenas de inmunoglobulina de los Acms se detectaron directamente por transferencia e inmunodetección con un anticuerpo de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a peroxidasa.

Para averiguar si la proteína M presente en las preparaciones de las cápsidas purificadas provenía de la envuelta viral, se añadió NP-40 hasta una concentración final del 1% a preparaciones de virus con Acms específicos para la proteína M unidos a su superficie, y la mezcla se agitó durante 10 minutos para romper las membranas del virus. Las cápsidas liberadas se sedimentaron por ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa al 25% en tampón TNE con NP-40 al 1%, a 27.000 rpm durante 50 minutos a 4°C en el rotor SW60.Ti de Beckmann. Las cápsidas se recuperaron en 30 µl de solución de carga para electroforesis SDS-

PAGE. La presencia de las cadenas de inmunoglobulina se estudió en los viriones y en las cápsidas por transferencia e inmunodetección.

EJEMPLO 1

5

IDENTIFICACIÓN DE LA SEÑAL DE ENCAPSIDACIÓN EN EL GENOMA DEL VIRUS TGEV

1. Materiales y Métodos

1.1 Diseño experimental

10 El diseño experimental para la identificación de la SE en el virus TGEV se basó en la detección de la encapsidación de RNAs mediante inmunocaptura de viriones acoplada a la detección de los RNAs por RT-PCR. Se estudió la secuencia de RNA que habría que añadir a un RNA subgenómico mensajero para que se encapsidara en viriones. Para ello, se tomó como base el minigenoma M39-GUS, que se encapsida específicamente, en contraste con el RNA mensajero subgenómico para el gen *gus* (sgmGUS o mRNA-GUS). Las secuencias que podrían
15 contener la SE (Figura 1) se clonaron después de la secuencia conservada CTAAAC (CUAAAC en el RNA) de la secuencia reguladora de la transcripción (TRS) del minigenoma (Figura 2). Los RNAs mensajeros derivados del minigenoma estarían formados por la secuencia líder fusionada a la secuencia conservada (CUAAAC) seguida del resto de la secuencia del
20 minigenoma. Estos minigenomas producirían mRNAs subgenómicos que potencialmente contendrían la región responsable de la encapsidación del genoma, y estos mensajeros, en principio, se encapsidarían en viriones.

1.2 Clonaje en el minigenoma M39-GUS de las secuencias que potencialmente contienen la SE

25 Para la selección de las secuencias que potencialmente contendrían la SE se partió del minigenoma M33, el más pequeño que se rescata eficientemente en cultivos celulares (Figuras 1 y 3). La SE se restringió a dos zonas discontinuas en el genoma del virus, presentes en la región 5' del minigenoma M33. La primera zona, la región A, se compone de los primeros 2.144 nucleótidos del extremo 5' del virus, y la segunda, la región B, procede de 568 nt de la secuencia solapante entre las ORFs 1a y 1ab, entre los nucleótidos 12.195 y 12.763 del genoma
30 del virus TGEV. A su vez, la región A se subdividió en fragmentos de 550 nt, que se solapaban 50 nt entre sí (Figura 1). Estos fragmentos se amplificaron por PCR utilizando oligonucleótidos sintéticos (Tabla 2) que flanqueaban cada una de las regiones, introduciendo secuencias de

restricción *Sa*II en los extremos de los fragmentos amplificados. Los fragmentos de PCR se digirieron directamente con el enzima *Sa*II y se clonaron en el plásmido pSL1190 (pCMV)-M39-GUS cortado con el enzima *Sa*II (Figura 2). Los plásmidos obtenidos se analizaron por secuenciación, seleccionando aquéllos que contenían las regiones A1, A2, A3, A4 y B en fase

5 (Figura 2).

Tabla 2
Oligonucleótidos empleados para la amplificación y clonaje de las regiones A y B

Región	Oligonucleótido (+)	Oligonucleótido (-)	Zona del genoma amplificada (nt)
A1	GGGTCGACGAAATATTGTCTT	CCGTCGACATGGCACCTCTGACAGTGC	100-649
	TCTATGAAATC	GAGC	
A2	GGGTCGACCGTTCTTGAGGACT	CCGTCGACCATCACCAGGCTTAATATC	599-1149
	TTGACCTTAAATG	ACCC	
A3	GGGTCGACTTCTGGCAAAGTT	CCGTCGACACGATTGTCTGGAAACCACA	1099-1649
	AAGGGTGTC	AATGTTGGC	
A4	GGGTCGACGCTTTTACGATTGT	CCGTCGACTTCAAATGATGAACCAAAGT	1599-2144
	AAACTACAAGCC	TTTGC	
B	GGGTCGACCAAATACCAACTG	CCGTCGACAATTCTTCAGTGCAAGCAC	12195-12763
	GCACACAAGATCC	CTACTGTC	

1.3 Rescate de los minigenomas generados

Se transfectaron en células epiteliales de testículo de cerdo (ST) por lipofección 5 µg de cada plásmido que incluían cada uno de los minigenomas bajo el control del promotor de CMV. Las células se infectaron con el virus TGEV a una multiplicidad de infección (mdi) de 5 a las 12 horas post-transfección. Los sobrenadantes obtenidos de la transfección/infección se utilizaron para infectar células ST confluentes (pase 1) y el sobrenadante se volvió a pasar otras dos veces en células ST (pases 2 y 3) (Figura 4).

1.3.1 Detección de minigenomas y mRNAs subgenómicos en células ST y en los viriones

El RNA de las células infectadas se purificó en el pase 3 y se detectaron los minigenomas y los mRNAs subgenómicos de los minigenomas por RT-PCR. Para la detección del minigenoma y de los mRNAs subgenómicos se realizó una reacción de RT utilizando el oligonucleótido GUS 297 (5'-GACCCACACTTTGCCGTAATGAG-3'). El minigenoma se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos GUS 297 y 19949 (5'-CTTGGTGGATCTGTTGCC-3'). El mRNA subgenómico se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos GUS 297 y líder. Los productos de las RT-PCRs se analizaron por electroforesis en gel de agarosa junto con marcadores de tamaño molecular.

Los viriones generados de las células infectadas (pase 3) se concentraron y se inmunopurificaron. El análisis de los minigenomas y mRNAs se realizó por RT-PCR.

20 **2. Resultados**

2.1 Detección de RNAs genómico y subgenómicos en células ST infectadas con el virus TGEV

En primer lugar se puso a punto la detección de RNAs subgenómicos del virus en células infectadas con el virus TGEV. Se diseñaron amplificaciones por RT-PCR específicas para cada uno de los RNAs subgenómicos, utilizando los oligonucleótidos específicos descritos anteriormente. Los productos de las reacciones de RT-PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. Los productos mayoritarios de las reacciones de RT-PCR mostraron el tamaño esperado para cada uno de los RNAs del virus. Estos productos se secuenciaron para confirmar que correspondían a los distintos mRNAs del virus TGEV (Figura 5).

2.2 Detección de los RNAs genómico y subgenómicos en preparaciones de virus purificados

2.2.1 Purificación de los viriones TGEV

Para comprobar si la detección de mRNAs subgenómicos en viriones purificados dependía del proceso de purificación, es decir, para determinar si se encapsidaban específicamente o si eran contaminaciones, se obtuvieron preparaciones de virus purificados utilizando tres métodos distintos. El primer método consistió en la concentración de virus por ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa al 31%, partiendo de sobrenadantes de células ST infectadas. En el segundo método, además de la concentración a través del colchón de sacarosa, el virus se purificó por centrifugación en un gradiente continuo de sacarosa. En el tercer método se cambió de estrategia. El virus previamente concentrado por ultracentrifugación se purificó por inmunocaptura con el Acm 25.22, específico para el extremo amino de la proteína M. La pureza de las preparaciones de virus se estimó mediante análisis por electroforesis SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata en el caso de los dos primeros métodos, y mediante electroforesis SDS-PAGE y fluorografía en el tercer método, utilizando virus marcado radiactivamente (Figura 6). En el virus concentrado se detectaron las tres proteínas estructurales mayoritarias del virus y proteínas contaminantes de alto peso molecular. En las preparaciones de virus purificado por gradiente de sacarosa y por inmunocaptura no se detectaron proteínas contaminantes.

2.2.2 Detección de los RNAs genómico y subgenómicos en preparaciones de virus purificados

A continuación se investigó la presencia de los RNAs genómico y subgenómicos en las preparaciones de virus purificado amplificados por RT-PCR (Figura 7). En el virus concentrado se detectaron el genoma y los RNAs subgenómicos S, E y M. En el virus purificado por gradiente de sacarosa se detectaron el genoma y los mRNAs E y M, pero no el S, previamente detectado. En el virus purificado por inmunocaptura se detectaron el genoma y el mRNA E. Cuando durante la inmunocaptura se incrementó el número de lavados de 10 a 15 veces en ausencia de detergente, o incluyendo el detergente Tween-20 a dos concentraciones (0,05% y 0,5%), solo se detectó el RNA genómico. Debido a que la detección de los mRNAs del virus dependía del proceso de purificación de los virus, y a que cuando se extremó la pureza de los viriones no se identificó la presencia de mRNAs en los mismos, se concluyó que los mRNAs detectados en virus purificado eran contaminantes y no se habían encapsidado.

2.3 Detección del minigenoma M39-GUS y del subgenómico sgmlGUS en células infectadas y en viriones purificados por inmunocaptura

Para determinar la encapsidación de RNAs de minigenomas que no se perdían durante pases sucesivos en cultivos celulares (Alonso y cols., 2002), se utilizó un sistema basado en la infección de células ST con preparaciones de virus TGEV que contenían viriones con el minigenoma M39-GUS. Este minigenoma presenta las señales necesarias para su replicación y encapsidación, e incorpora una unidad transcripcional compuesta por una TRS derivada del gen N seguida del gen trazador *gus*. Este minigenoma se replica en las células infectadas y también transcribe el mRNA subgenómico para el gen *gus* (sgmlGUS o mRNA-GUS). Se diseñó una estrategia de detección específica para el minigenoma M39-GUS y su mensajero por RT-PCR (Figura 8A). Para la detección específica del mRNA se utilizó un oligonucleótido que hibridaba con el gen *gus* junto con un oligonucleótido complementario a la secuencia líder del genoma del virus y de los mRNAs subgenómicos. En principio, utilizando esta RT-PCR se debería detectar el minigenoma M39-GUS, aunque en las condiciones en las que se realizó la RT-PCR (es decir, tiempos de elongación cortos) únicamente se amplificó el mensajero GUS, con 374 pb, pero no el producto derivado del minigenoma con una longitud teórica de 3.700 pb.

La presencia del genoma, minigenoma y el mRNA-GUS se investigó en células infectadas y en viriones purificados por inmunocaptura a partir de los sobrenadantes de estas células infectadas (Figura 8B). En las células se detectaron los RNAs correspondientes al genoma, al minigenoma M39-GUS y al mRNA GUS. La naturaleza de estas bandas se confirmó secuenciando los productos de las reacciones de RT-PCR. En la reacción para la detección del mRNA-GUS apareció un producto inesperado con un tamaño aproximado de 1.070 nt. Este producto se secuenció comprobándose que se generó en la reacción de RT-PCR por hibridación inespecífica del oligonucleótido GUS con el extremo 5' del genoma y del minigenoma. En los viriones purificados por inmunocaptura se detectó el RNA genómico, el minigenoma M39-GUS, pero no el mensajero GUS, en contraste con los resultados obtenidos en las células infectadas. La banda inespecífica de 1.070 nt también se detectó en los viriones inmunopurificados. En análisis sucesivos se empleó el oligonucleótido GUS 297, que no hibridó inespecíficamente con el genoma.

2.4 Identificación de la SE en el genoma del virus TGEV

Una vez comprobado que los mRNAs subgenómicos no se encapsidan en viriones, en contraste con los minigenomas, se diseñaron construcciones basadas en el minigenoma M39-GUS que produjeran mRNAs subgenómicos incluyendo secuencias que
5 potencialmente contuvieran la SE. El minigenoma más pequeño derivado del virus TGEV que se rescató eficientemente en cultivos celulares era el M33 (Figura 9A), lo que sugería que este minigenoma incluía la SE en el extremo 5' del minigenoma. Esta SE en principio procedía de dos zonas discontinuas del genoma del virus, A y B, que se localizaban en los primeros 2.144 nt del genoma del virus o en los 568 nt de la región solapante entre los
10 genes 1a y 1b (del nucleótido 12.195 al nucleótido 12.763), respectivamente (Figura 9B).

Para localizar la posición de la SE, la zona A se subdividió en cuatro fragmentos de 550 nt, que se solapan entre sí a lo largo de 50 nt (Figura 9B). Estos fragmentos, además de la región B, se amplificaron por PCR, y cada fragmento se clonó en el minigenoma M39-GUS directamente bajo el control de la TRS optimizada, siguiendo a la secuencia
15 conservada 5'-CUAAAC-3' y la secuencia que flanquea el lado 3' de la secuencia CS (5'-ACGTCGACGA-3') (Figura 10).

Los minigenomas generados se transfectaron en células ST donde se transcribieron bajo el promotor de CMV. Los minigenomas generados se rescataron por infección con el virus complementador TGEV. Los viriones generados en las células ST transfectadas e
20 infectadas se pasaron tres veces en cultivos celulares para amplificar los minigenomas.

La presencia del genoma, minigenomas y mRNAs se estudió en las células infectadas y en los viriones purificados. Independientemente de la secuencia introducida en los minigenomas, el genoma, los minigenomas y sus mensajeros se detectaron en las células infectadas (Figura 11). Sin embargo, en los viriones purificados a partir de las células
25 infectadas solo se detectó el mRNA cuando los viriones se habían producido en células que se transfectaron con el minigenoma M39-GUS-A1. En contraste, en el resto de los virus purificados a partir de las otras células transformadas solamente se detectó el genoma y los minigenomas, pero no los mRNAs.

En el caso de los viriones procedentes de las células infectadas en presencia del
30 minigenoma que contenía la secuencia A1, el RNA más abundante fue el mRNA-A1, es decir, el que incluía la secuencia del genoma desde el nucleótido 100 al 649. Incluso comparando los productos de las reacciones de RT-PCR con el resto de las construcciones,

se observó repetidamente que el genoma del virus en el caso de la construcción A1 estaba presente en menor cantidad que en el resto de las construcciones, tal como se determinó por RT-PCR. Estos resultados sugirieron fuertemente que el mRNA-A₁ se encapsidaba muy eficientemente, inhibiendo la encapsidación del propio genoma del virus.

5 Los resultados obtenidos indican que la SE del virus se localizó en el extremo 5' del genoma, entre los nucleótidos 100 y 649, ya que su inserción en un mRNA subgenómico que no se encapsida, dio lugar a su encapsidación eficiente en viriones. Este resultado difiere del obtenido en los coronavirus MHV y BCoV, en los que la SE se ha localizado alejada del extremo 5' del virus, alrededor de la posición 20.300 del genoma de estos virus
10 (Figura 12).

3. Discusión

El virus TGEV encapsidó el RNA genómico y los minigenomas, pero no los mRNAs del virus. Para la identificación de la SE se utilizó una estrategia de acción positiva, es decir, en la que se mostrase la encapsidación de mRNAs como consecuencia de
15 la inserción de señales de encapsidación en los mismos. Esta estrategia consistió en la inserción de regiones provenientes del extremo 5' del minigenoma M33, bajo el control de la secuencia TRS del minigenoma M39-GUS. De esta manera, en las células infectadas en presencia de estos minigenomas se producirían mRNAs con las secuencias indicadas clonadas en el minigenoma. Estas construcciones se rescataron en células ST transfectadas
20 e infectadas con el virus TGEV complementador. En los viriones liberados de las células infectadas se detectaron solamente los mensajeros que contenían la secuencia comprendida desde las posiciones 100 a 649 del genoma, indicando que la SE se encuentra en este fragmento de RNA. Dado que estas señales de encapsidación tienen un tamaño inferior a 100 nt, tal como se ha descrito en el coronavirus MHV (Fosmire y cols., 1992), queda
25 pendiente por determinar las secuencias mínimas necesarias para la encapsidación de RNAs en el virus TGEV.

El RNA genómico fue el más abundante en virus purificados procedentes de células infectadas con virus en presencia de minigenomas. Sin embargo, cuando los minigenomas contenían la capacidad para transcribir mRNAs que incluían la SE, el RNA más abundante
30 en virus purificados fue el mRNA. Este resultado indicó que el RNA mensajero que contenía la SE se incorporaba a los viriones muy eficientemente, en detrimento de la encapsidación del RNA genómico y del minigenoma que lo generaba. Posiblemente, la

menor cantidad de RNA genómico en los viriones purificados en presencia del minigenoma M39-GUS-A1 y su mRNA, se debió a la competición por la encapsidación entre el genoma del virus, el minigenoma y el mRNA.

La encapsidación podría estar en principio asociada a la replicación del genoma, tal como sucede en poliovirus y flavivirus (Khromykh y cols., 2001; Nugent y cols., 1999). Sin embargo, es poco probable que este sea el caso de los coronavirus, porque la encapsidación de mRNAs mediada por la SE en el caso del virus TGEV así como en el coronavirus MHV (Woo y cols., 1997), es independiente de la replicación del RNA, dado que los mRNAs no se replican (el mecanismo de replicación y transcripción tiene diferentes requerimientos en los coronavirus) (Bos y cols., 1997; Woo y cols., 1997). Sin embargo, no se puede excluir que la encapsidación de mRNAs en los que se ha introducido artificialmente la SE esté asociada a la transcripción de estos mRNAs, que es el mecanismo por el cual se sintetizan (Baker y Lai, 1990; Sawicki y Sawicki, 1998; van Marle y cols., 1999).

Los resultados obtenidos indican que la SE del virus TGEV se encuentra entre los nucleótidos 100 y 649 del genoma del virus. Ello es sorprendente, dado que la SE en el coronavirus MHV se ha situado a 1,4 kb del extremo 3' del gen de la replicasa (Fosmire y cols., 1992), es decir, una zona que está a casi 20.000 nt de la descrita aquí para la SE en el genoma del virus TGEV. Se desconoce la razón de esta diferencia en la localización de la SE.

Las señales de encapsidación en distintos virus presentan una estructura secundaria definida, con estructuras de RNA en horquilla reconocidas específicamente por las nucleoproteínas de los virus (Fosmire y cols., 1992; Kim y cols., 1998; Woo y cols., 1997; Zhong y cols., 1992).

La localización de la SE en el genoma del virus TGEV tiene una gran importancia práctica, además de científica. A modo ilustrativo, se pueden desarrollar vectores virales útiles para el desarrollo de vacunas y terapia génica derivados del virus TGEV en los que, como medida de seguridad para evitar la propagación del vector *in vivo*, se han delecionado genes esenciales para el ensamblaje del virus (Figura 13). Para aumentar el nivel de bioseguridad del vector, una vez acotada la SE, se puede relocalizar desde el extremo 5' del genoma al extremo 3' del genoma, inmediatamente al lado del gen delecionado (Figura 13). De esta manera se evitará la regeneración de virus infeccioso a partir de una recombinación entre el vector y un virus de campo. En el caso de que la recombinación tuviera lugar, el

virus de campo adquiriría el extremo 3' del vector, recuperando los genes delecionados. Sin embargo, este proceso conllevaría la pérdida de la SE, por lo que no se podría propagar. Únicamente en el caso de una doble recombinación el vector recuperaría tanto la SE como los genes delecionados. Sin embargo, una triple recombinación que llevara a la recuperación de dos genes esenciales delecionados, además de la SE, es un evento poco frecuente (frecuencia de recombinación en torno a $1 \times 10^{-4} \times 1 \times 10^{-4} \times 1 \times 10^{-4} = 1 \times 10^{-12}$) (Sánchez y cols., 1999), lo que añadiría un componente de seguridad adicional al vector que presenta deleciones de genes esenciales exclusivamente (Figura 13).

La identificación de la SE del genoma permite el estudio de los mecanismos de encapsidación de coronavirus y la generación de nuevos vectores virales bioseguros para el diseño de nuevas vacunas y para terapia génica, aplicables en salud animal y humana.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, S., Izeta, A., Sola, I. y Enjuanes, L. (2002). Transcription regulatory sequences and mRNA expression levels in the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.* 76:1293-1308.
- 5 **Ansorge, W.** (1985). Fast and sensitive detection of protein and DNA bands by treatment with potassium permanganate. *J. Biochem. Biophys. Methods* 11:13-20.
- Baker, S. C. y Lai, M. M. C.** (1990). An *in vitro* system for the leader-primed transcription of coronavirus messenger RNAs. *EMBO J.* 9:4173-4179.
- Bos, E. C. W., Dobbe, J. C., Luytjes, W. y Spaan, W. J. M.** (1997). A subgenomic mRNA transcript of the coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 defective interfering (DI) RNA is packaged when it contains the DI packaging signal. *J. Virol.* 71:5684-5687.
- 10 **Bullock, W., Fernández, J.M. y Short, J.M.** (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA E.coli* strain with β -galactosidase selection. *Biotechniques* 8:26-27.
- Charley, B. y Laude, H.** (1988). Induction of alpha-interferon by transmissible gastroenteritis coronavirus: Role of transmembrane glycoprotein E1. *J. Virol.* 62:8-10.
- 15 **Cologna, R. y Hogue, B. G.** (2000). Identification of a bovine coronavirus packaging signal. *J. Virol.* 74:580-583.
- Doyle, L.P. y Hutchings, L.M.** (1946). A transmissible gastroenteritis in pigs. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 108:257-259.
- 20 **Fosmire, J. A., Hwang, K. y Makino, S.** (1992). Identification and characterization of a coronavirus packaging signal. *J. Virol.* 66:3522-3530.
- Haelterman, E.O. y Pensaert, M.B.** (1967). Pathogenesis of transmissible gastroenteritis of swine. *Proc. 18th World Vet. Congreso* 2:569-572.
- Homann, H.E., Willenbrink, W., Buchholz, C.J y Neubert, W.J.** (1991). Sendai virus protein-protein interactions studied by a protein-blotting protein-overlay technique: mapping of domains on NP protein required for binding to P protein. *J. Virol.* 65:1304-1309.
- 25 **Izeta, A., Smerdou C., Alonso, S., Penzes, Z., Méndez, A., Plana-Durán, J. y Enjuanes, L.** (1999). Replication and packaging of transmissible gastroenteritis coronavirus-derived synthetic minigenomes. *J. Virol.* 73:1535-1545.
- 30 **Jiménez, G., Correa, I., Melgosa, M.P., Bullido, M.J. y Enjuanes, L.** (1986). Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *J. Virol.* 60:131-139.
- Khromykh, A. A., Varnavski, A. N., Sedlak, P. y Westaway, E. G.** (2001). Coupling

- between replication and packaging of flavivirus RNA: Evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin Virus. *J. Virol.* **75**:4633-4640.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- 5 **Laude, H., Gelfi, J., Lavenant, L. y Charley, B.** (1992). Single amino acid changes in the viral glycoprotein M affect induction of alpha interferon by the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.* **66**:743-749.
- Martín-Alonso, J.M., Balbín, M., Garwes, D.J., Enjuanes, L., Gascón, S. y Parra, F.** (1992). Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus nucleoprotein. *Virology*
10 **188**:168-174.
- Martín Ndrés, A. y Luna del Castillo, J. d. D.** (1994). *Bioestadística para las ciencias de la salud*. 4ª edición. Ediciones Norma, S.A., Madrid.
- McClurkin, A.W. y Noman, J.O.** (1996). Studies on transmissible gastroenteritis of swine. II. Selected characteristics of a cytopathogenic virus common to five isolates from
15 transmissible gastroenteritis. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* **30**:190-198.
- Motulsky, H.** (1995). *Intuitive Biostatistics*. Oxford University Press. Nueva York.
- Nugent, C. I., Johnson, K. L., Sarnow, P. y Kirkegaard, K.** (1999). Functional coupling between replication and packaging of poliovirus replicon RNA. *J. Virol.* **73**:427-435.
- Risco, C., Antón, I. M., Suñé, C., Pedregosa, A. M., Martí-Alonso, J. M., Parra, F.,
20 Carrascosa, J. L. y Enjuanes, L.** (1995). Membrane protein molecules of transmissible gastroenteritis coronavirus also expose the carboxy-terminal region on the external surface of the virion. *J. Virol.* **69**:5269-5277.
- Sambrook et al.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed Cold Spring Harbor Laboratory.
- 25 **Sánchez, C. M., Jiménez G., Laviada, M.D., Correa, I., Suñé, C., Bullido, M.J., Gebauer, F., Smerdou, C., Callebant, P., Escribano, J.M. y Enjuanes, L.** (1990). Antigenic homology among coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus. *Virology* **174**:410-417.
- Sánchez, C. M., Izeta, A., Sánchez-Morgado, J. M., Alonso, S., Sola, I., Balasch, M.,
30 Plana-Durán, J. y Enjuanes, L.** (1999). Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. *J. Virol.* **73**:7607-7618.

- Sawicki, S. G. y Sawicki, D. L. (1986). Coronavirus minus-strand RNA synthesis and effect of cycloheximide on coronavirus RNA synthesis. *J. Virol.* **57**:328-334.
- Suñe, C., Jiménez G., Correa, I., Bullido, M.J., Gebauer, F., Smerdou, C. y Enjuanes, L. (1990). Mechanisms of transmissible gastroenteritis coronavirus neutralization. *Virology* **177**:559-569.
- 5 van Marle, G., Dobbe, J. C., Gultyaev, A. P., Luytjes, W., Spaan, W. J. M. y Snijder, E. J. (1999). Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by base pairing between sense and antisense transcription-regulating sequences. *Proc. Nat. Acad. Sc. USA* **96**:12056-12061.
- 10 Wesley, R.D., Woods, R.D., Correa, I. y Enjuanes, L. (1988). Lack of protection *in vivo* with neutralizing antibodies to transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Microbiol.* **18**:197-208.
- Woo, K., Joo, M., Narayanan, K., Kim, K. H. y Makino, S. (1997). Murine coronavirus packaging signal confers packaging to nonviral RNA. *J. Virol.* **71**:824-827.
- 15 Woods, R.D., Wesley, R.D. y Kapke, P.A. (1987). Complement-dependent neutralization of transmissible gastroenteritis virus by monoclonal antibodies. *Adv. Exp. Med. Biol.* **218**:493-500.
- Zhong, W. D., Dasgupta, R. y Rueckert, R. (1992). Evidence that the packaging signal for nodaviral RNA2 is a bulged stem-loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:11146-11150.
- 20 Zucker, M. (1989a). Computer prediction of RNA structure. *Methods Enzymol.* **180**:262-288.
- Zucker, M. (1989b). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* **244**:48-52.

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre:

- 5 a) una secuencia de nucleótidos que comprende desde el nucleótido 100 al nucleótido 649 del genoma de un coronavirus del grupo 1, incluyendo dicha secuencia de nucleótidos la secuencia de encapsidación de dicho coronavirus;
- b) una secuencia de ácido nucleico análoga a la secuencia definida en a) que contiene la secuencia de encapsidación de un coronavirus del grupo 1;
- c) una secuencia de ácido nucleico complementaria a cualquiera de dichas secuencias a) o b); y
- 10 d) una secuencia de un ácido nucleico con una estructura secundaria similar a la de una secuencia de encapsidación (SE) de un coronavirus del grupo 1, independientemente de la secuencia primaria de nucleótidos.

15 2. Secuencia según la reivindicación 1, en el que dicho ácido nucleico es cualquier molécula de DNA o RNA.

3. Secuencia según la reivindicación 1, en el que dicho coronavirus del grupo 1 se selecciona del grupo formado por los coronavirus porcinos, caninos, felinos y humanos.

20 4. Secuencia según la reivindicación 1, constituida por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1, o por un fragmento de la misma, que contiene la secuencia de encapsidación del virus de gastroenteritis porcina transmisible (TGEV).

25 5. Una construcción de un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, junto con, opcionalmente, una secuencia promotora de la transcripción.

6. Un plásmido que contiene dicha secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o dicha construcción de ácido nucleico según la reivindicación 5.

7. Un vector que comprende

una secuencia de ácido nucleico (I) seleccionada entre (i) una secuencia de ácido nucleico correspondiente al genoma completo, o a una parte del mismo, de un coronavirus del grupo 1, y (ii) una secuencia de ácido nucleico de otro virus que tiene una identidad de secuencia igual o superior al 60% con dicha secuencia (i); a la que se le ha delecionado, al menos, un gen esencial para el ensamblaje de dicho virus; y

una secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

8. Vector según la reivindicación 7, en el que dicha secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, ha sido insertada en una posición de la secuencia de ácido nucleico (I) distinta a su posición original en el genoma del virus tipo salvaje, o en una posición adyacente al, o inmediatamente al lado del, gen delecionado, o de uno de los genes delecionados, en dicha secuencia de ácido nucleico (I).

9. Vector según la reivindicación 7, en el que dicha secuencia de ácido nucleico (I) es la secuencia del genoma completo de un coronavirus del grupo 1, o de un fragmento del mismo, al que se le ha delecionado, al menos, un gen esencial para el ensamblaje de dicho coronavirus y en el que dicha secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 se ha localizado en una posición distinta a la original en el coronavirus tipo salvaje.

10. Vector según la reivindicación 9, en el que dicha secuencia de ácido nucleico (I) es la secuencia del genoma completo de un coronavirus del grupo 1, o de un fragmento del mismo, al que se le ha delecionado, al menos, un gen esencial para el ensamblaje de dicho coronavirus y en el que dicha secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 se ha localizado en una posición adyacente al, o inmediatamente al lado del, gen delecionado o de uno de los genes delecionados.

11. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que comprende, además, una secuencia de un ácido nucleico heterólogo, que codifica una determinada actividad, bajo el control de los elementos reguladores de la transcripción presentes en dicho vector.

12. Un método para producir un producto de interés que comprende cultivar una célula hospedadora que contiene un vector según la reivindicación 11, bajo condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico heterólogo y recuperar el producto de interés.
- 5 13. Un método para producir un coronavirus recombinante que comprende introducir un vector viral según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 en una célula hospedadora, cultivar dicha célula hospedadora que contiene dicho vector bajo condiciones que permiten la expresión y replicación del vector y recuperar los viriones obtenidos del coronavirus recombinante.
- 10 14. Una célula hospedadora que comprende un vector según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11.
- 15 15. Una vacuna capaz de inducir protección en un animal frente a la infección causada por un agente infeccioso que comprende (i) al menos, un vector según la reivindicación 11, que expresa, al menos, un antígeno adecuado para inducir una respuesta inmune frente a dicho agente infeccioso, o un anticuerpo que proporciona protección contra dicho agente infeccioso, junto con, opcionalmente, (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 16. Vacuna según la reivindicación 15, en la que dicho vector expresa, al menos, un antígeno capaz de inducir una respuesta inmune sistémica y/o una respuesta inmune en mucosas frente a distintos agentes infecciosos que se propagan en mucosas respiratorias o entéricas.
- 25 17. Una vacuna multivalente capaz de inducir protección en un animal frente a la infección causada por más de un agente infeccioso que comprende (i) un vector según la reivindicación 11, que expresa, unos antígenos adecuados para inducir una respuesta inmune frente a dichos agentes infecciosos, o anticuerpos que proporcionan protección contra dichos agentes infecciosos, junto con, opcionalmente, (ii) un excipiente
- 30 farmacéuticamente aceptable.

18. Una vacuna multivalente capaz de inducir protección en un animal frente a la infección causada por más de un agente infeccioso que comprende (i) más de un vector según la reivindicación 11, cada uno de los cuales expresa un antígeno adecuado para inducir una respuesta inmune frente a cada uno de dichos agentes infecciosos, o anticuerpos que
- 5 proporcionan protección contra cada uno de dichos agentes infecciosos, junto con, opcionalmente, (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

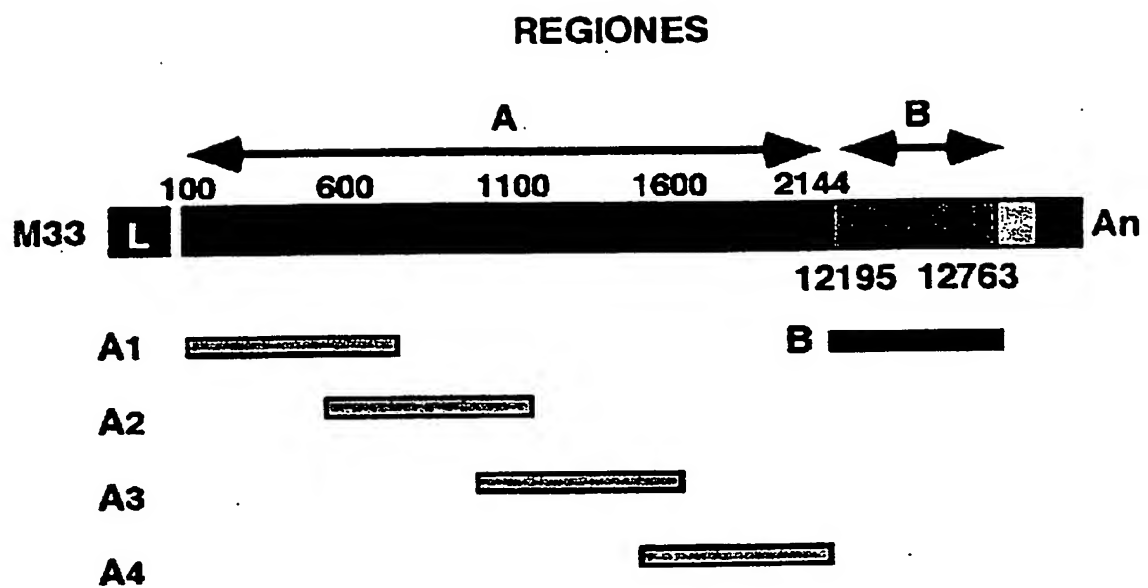
FIGURA 1

FIGURA 2

3/13

FIGURA 3

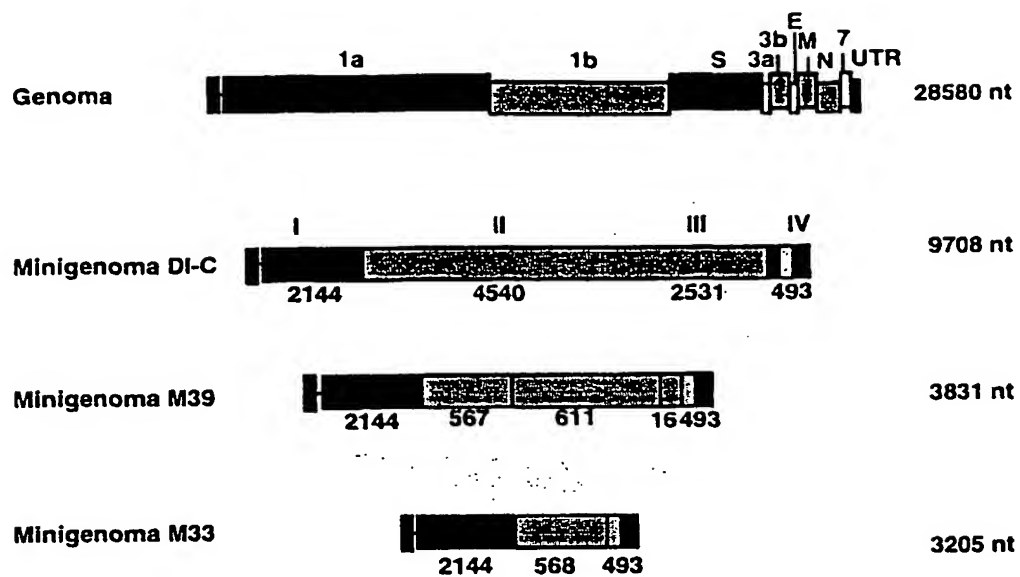


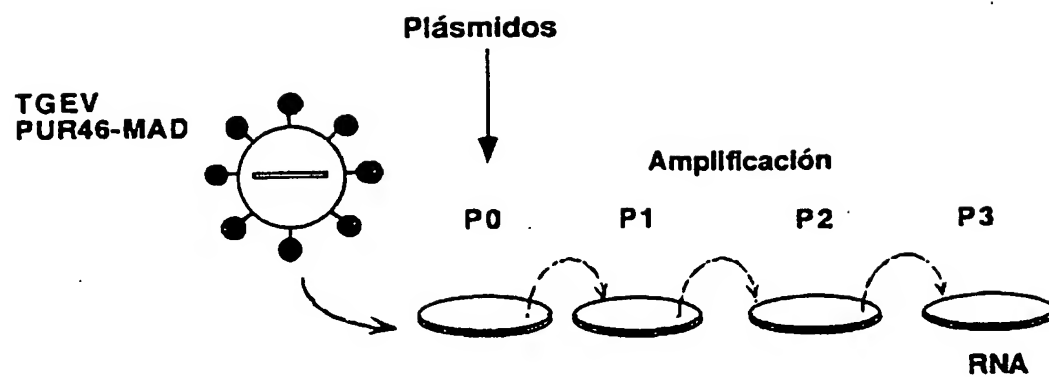
FIGURA 4

FIGURA 5

5/13

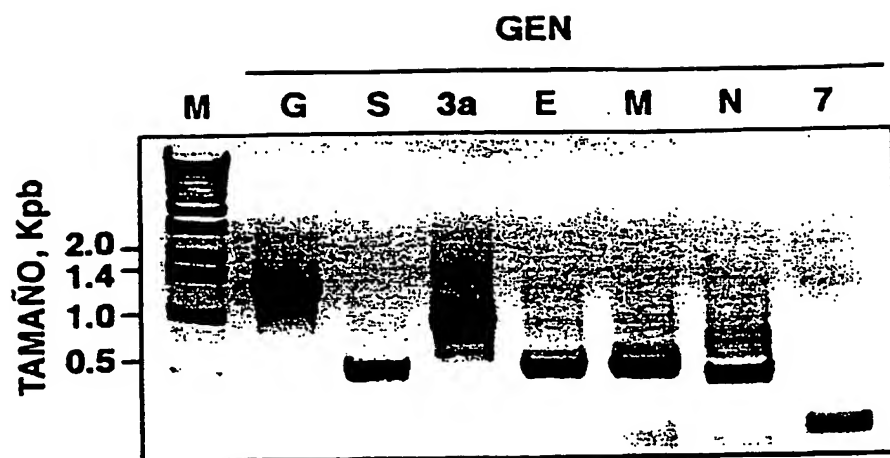
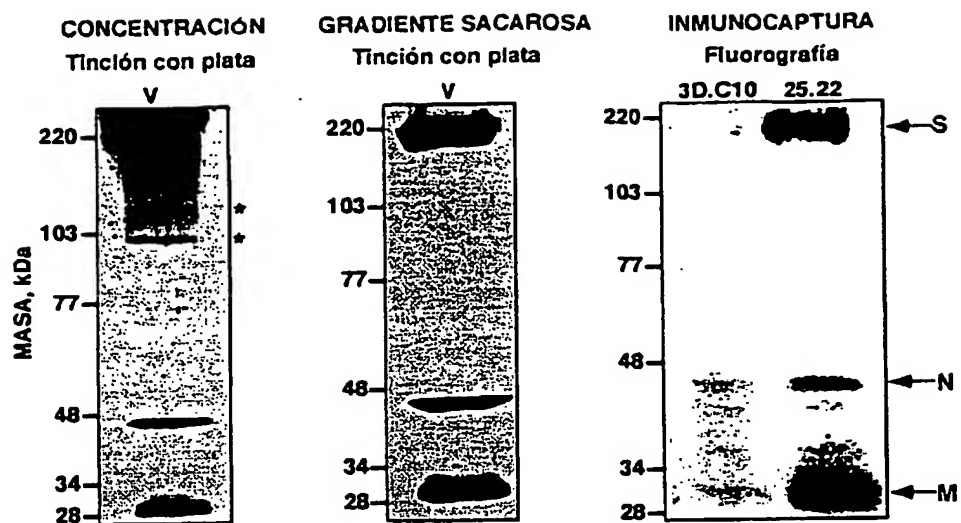


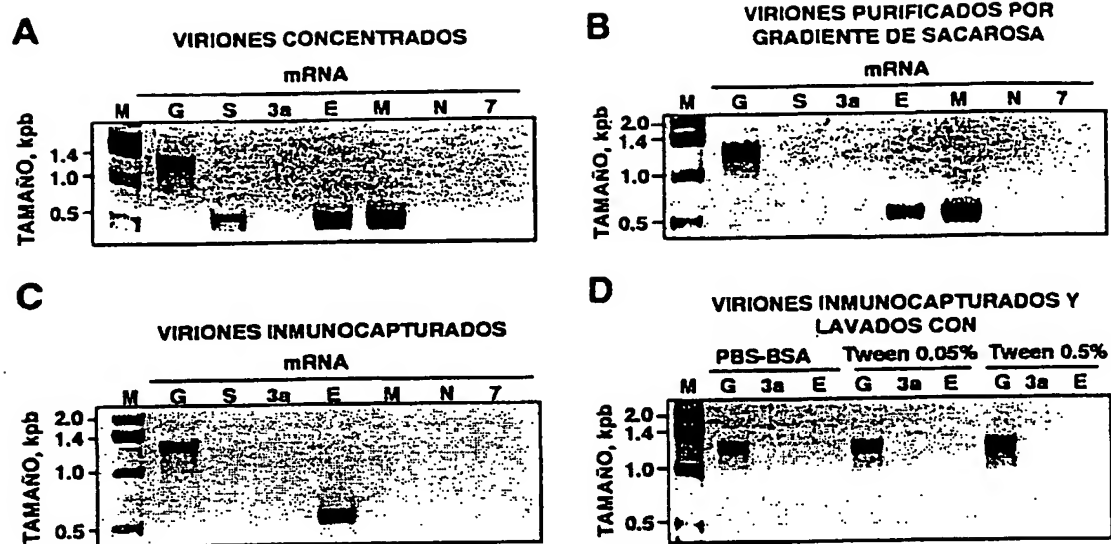
FIGURA 6

6/13



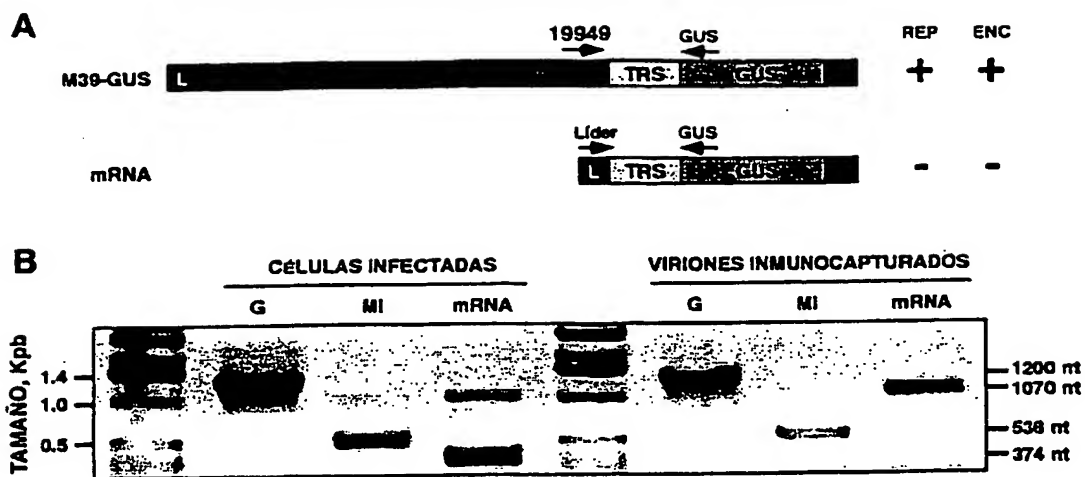
7/13

FIGURA 7



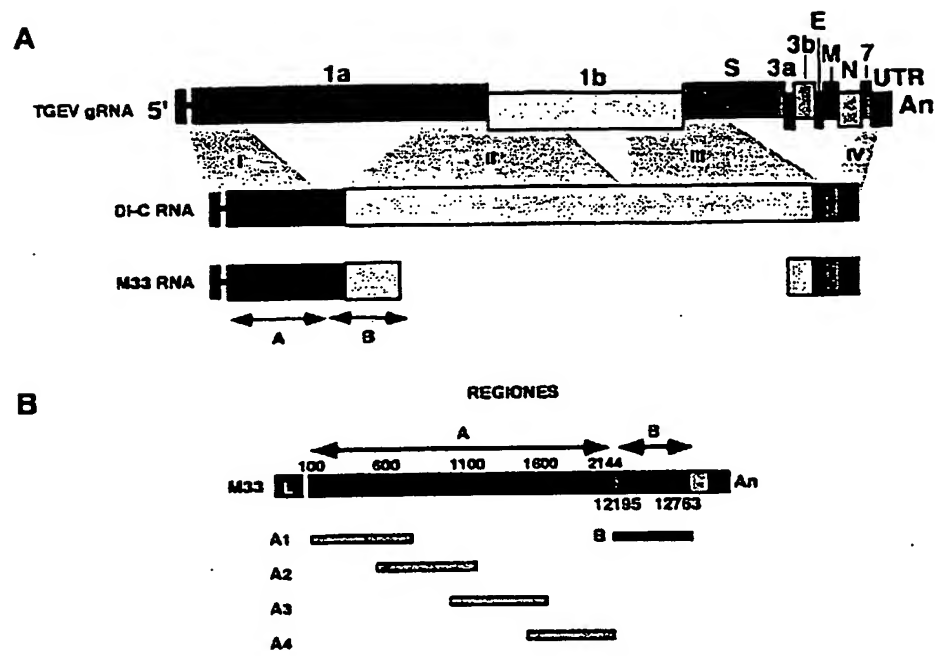
8/13

FIGURA 8

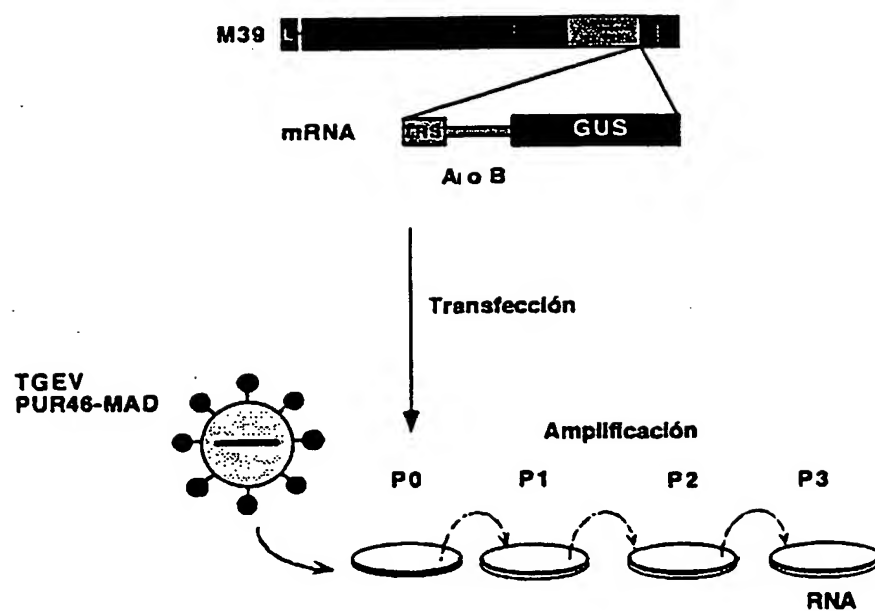


9/13

FIGURA 9

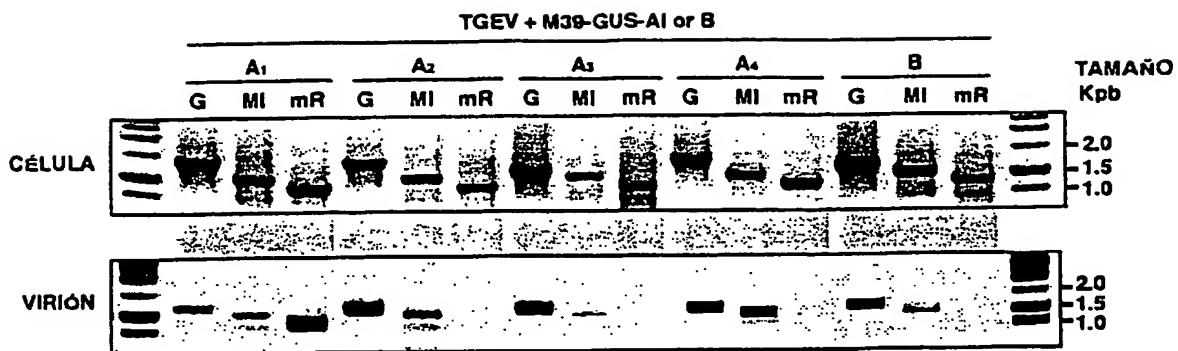


10/13

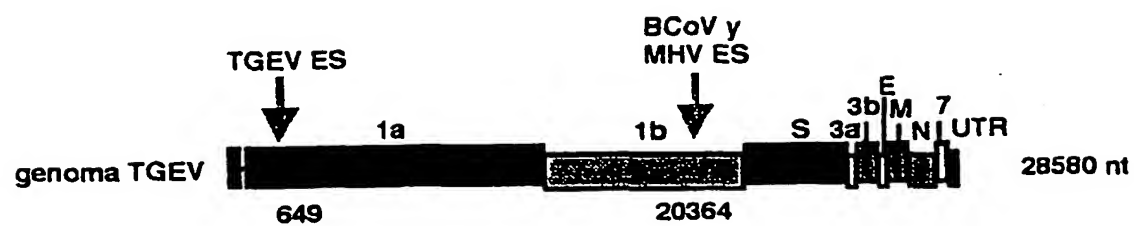
FIGURA 10

11/13

FIGURA 11

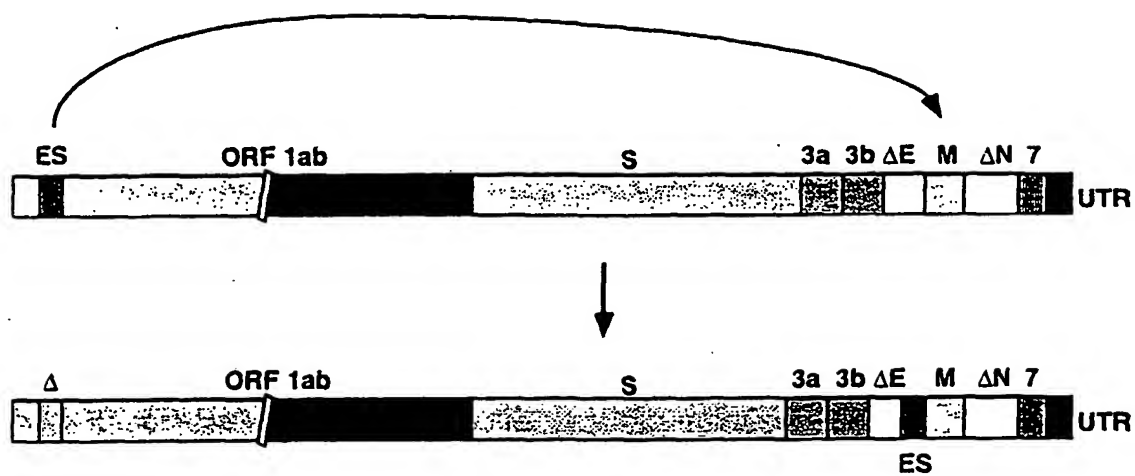


12/13

FIGURA 12

13/13

FIGURA 13



LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

- 5 <120> Secuencia de acido nucleico que comprende la señal de encapsidación del rna de un coronavirus del grupo 1 y sus aplicaciones

<160> 1

- 10 <170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 550

<212> ADNc

- 15 <213> Virus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV)

<400> 1

	GAAATATTTG	TCTTTCTATG	AAATCATAGA	GGACAAGCGT	TGATTATTTT	CATTCAGTTT	60
	GGCAATCACT	CCTTGGAACG	GGGTTGAGCG	AACGGTGACG	TAGGGTTCCG	TCCCTATTTT	120
20	GTAAGTCGCC	TAGTAGTAGC	GAGTGCGGTT	CCGCCCCGTAC	AACGTTGGGT	AGACCGGGTT	180
	CCGTCCTGTG	ATCTCCCTCG	CCGGCCGCCA	GGAGAATGAG	TTCCAAACAA	TTCAAGATCC	240
	TTGTTAATGA	GGACTATCAA	GTCAACGTGC	CTAGTCTTCC	TATTCGTGAC	GTGTTACAGG	300
	AAATTAAGTA	CTGCTACCGT	AATGGATTTG	AGGGCTATGT	TTTCGTACCA	GAATACTGTC	360
	GTGACCTAGT	TGATTGCGAT	CGTAAGGATC	ACTACGTCAT	TGGTGTTCTT	GGTAACGGAG	420
25	TAAGTGATCT	TAAACCTGTT	CTTCTTACCG	AACCCCTCCGT	CATGTTGCAA	GGCTTTATTG	480
	TTAGAGCTAA	CTGCAATGGC	GTTCTTGAGG	ACTTTGACCT	TAAAATTGCT	CGCACTGGCA	540
	GAGGTGCCAT						550

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/ES 03/00038

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 : C12N 15/11, 15/86, A61K 39/1215, A61K 39/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 : C12N, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	ES 2109189 A1 (CYANAMID IBÉRICA, S.A.) 01.01.1998. the whole document	1-7 8-18
Y	WO 0144458 A2 (NOVARTIS A.G.) 21.06.2001. page 32, lines 16-34; pages 33-35; pages 44-45.	8-18
A	WO 0049168 A2 (MERCK & CO. INC.) 24.08.2000. the whole document	8-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 April 2003 (29.04.03)

Date of mailing of the international search report

19 May 2003 (19.05.03)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 1-2
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The search was directed to SEQ. ID. No. 1, which appears in
Claim 4, given the lack of clarity of Claims 1 and 2 (PCT Rule
6.3).
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No

PCT/ES 03/00038

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES 2109189 A1	01.01.1998	WO 9734008 A1 AU 1927797 A MX 9807466 A1 CN 1218513 A KR 99087724 A BR 9708061 A EP 1008652 A1 HU 200000356 A2 JP 2000513565 T AU 729044 B2	18.09.1997 01.10.1997 01.05.1999 02.06.1999 27.12.1999 04.01.2000 14.06.2000 28.06.2000 17.10.2000 25.01.2001
WO 0144458 A2	21.06.2001	AU 200122598 A US 2002098475 A1 EP 1238092 A2	25.06.2001 25.07.2002 11.09.2002
WO 0049168 A2	24.08.2000	AU200035961 A US 2001041173 A1 EP 1155136 A2 US 2002146392 A1	04.09.2000 15.11.2001 21.11.2001 10.10.2002

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n.
PCT/ES 03/00038

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ C12N 15/11, 15/86, A61K 39/1215, A61K 39/42

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ C12N, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X Y	ES 2109189 A1 (CYANAMID IBÉRICA, S.A.) 01.01.1998. Todo el documento.	1-7 8-18
Y	WO 0144458 A2 (NOVARTIS A G.) 21.06.2001. Página 32, líneas 16-34; páginas 33-35; páginas 44-45.	8-18
A	WO 0049168 A2 (MERCK & CO. INC.) 24.08.2000. Todo el documento.	8-14

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 29 abril 2003 (29.04.2003)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

19 MAY 2003

19. 05.03

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M

Funcionario autorizado

Eva RELAÑO REYES

c/ Panamá 1, 28071 Madrid, España
n° de fax +34 91 3495304

n° de teléfono +34913493047

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 03/00038

Recuadro I Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17.2.a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n°: se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☒ Las reivindicaciones n°: 1-2 se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
La búsqueda se ha llevado a cabo sobre la SEC. ID. n° 1 que figura en la reivindicación 4 dada la falta de claridad de las reivindicaciones 1 y 2 (Regla 6.3)
3. ☐ Las reivindicaciones n°: son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4.a).

Recuadro II Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°:

Indicación en cuanto a la reserva ☐ Las tasas adicionales han sido acompañadas de una reserva por parte del solicitante.
☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna reserva.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
 Información relativa a miembros de familia de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES 03/00038

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
ES 2109189 A1	01.01.1998	WO 9734008 A1 AU 1927797 A MX 9807466 A1 CN 1218513 A KR 99087724 A BR 9708061 A EP 1008652 A1 HU 200000356 A2 JP 2000513565 T AU 729044 B2	18.09.1997 01.10.1997 01.05.1999 02.06.1999 27.12.1999 04.01.2000 14.06.2000 28.06.2000 17.10.2000 25.01.2001
WO 0144458 A2	21.06.2001	AU 200122598 A US 2002098475 A1 EP 1238092 A2	25.06.2001 25.07.2002 11.09.2002
WO 0049168 A2	24.08.2000	AU200035961 A US 2001041173 A1 EP 1155136 A2 US 2002146392 A1	04.09.2000 15.11.2001 21.11.2001 10.10.2002

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.